Biochemische Zeitschrift

Begründet von **C. Neuberg**

Unter Mitwirkung von

E. Abderhalden - Halle a. d. S., **M. Ascoli** - Palermo, **L. Asher** - Bern, **A. Bach** - Moskau, **G. Barger** - Edinburgh, **M. Bergmann** - New York, **G. Bertrand** - Paris, **A. Bickel** - Berlin, **Fr. Boas** - München, **J. Bodnár** - Debreczen, **A. Bonanni** - Rom, **F. Bottazzi** - Neapel, **G. Bredig** - Karlsruhe i. B., **Wl. Butkewitsch** - Moskau, **T. Chrzaszcz** - Posen, **R. Doerr** - Basel, **A. Durig** - Wien, **R. Ege** - Kopenhagen, **H. v. Euler** - Stockholm, **M. Ferreira de Mira** - Lissabon, **H. Fink** - Berlin, **S. Flexner** - New York, **J. Forssman** - Lund, **O. Fürth** - Wien, **E. Hammarsten** - Stockholm, **F. Hayduck** - Berlin, **E. Hägglund** - Stockholm, **V. Henri** - Lüttich, **V. Henriques** - Kopenhagen, **K. Hess** - Berlin, **W. Heubner** - Berlin, **P. Karrer** - Zürich, **G. Klein** - Heidelberg, **W. Klein** - Bonn, **A. J. Kluyver** - Delft, **M. Kochmann** - Halle a. d. S., **H. Kraut** - Dortmund, **R. Krimberg** - Riga, **O. Lemmermann** - Berlin, **P. A. Levene** - New York, **K. Lohmann** - Heidelberg, **H. Lüers** - München, **Th. Madsen** - Kopenhagen, **E. Mangold** - Berlin, **L. Marchlewski** - Krakau, **A. McKenzie** - Dundee, **Kurt H. Meyer** - Genf, **O. Meyerhof** - Heidelberg, **L. Michaelis** - New York, **H. Molisch** - Wien, **W. Nernst** - Berlin, **K. Noack** - Berlin, **C. v. Noorden** - Wien, **Orla-Jensen** - Kopenhagen, **W. Ostwald** - Leipzig, **A. Palladin** - Charkow, **J. K. Parnas** - Lemberg, **W. Pauli** - Wien, **W. H. Peterson** - Madison, **R. Pfeiffer** - Breslau, **E. P. Pick** - Wien, **J. Pohl** - Hamburg, **D. N. Prianischnikow** - Moskau, **St. J. von Przyłęcki** - Warschau, **A. Rippel** - Göttingen, **H. Sachs** - Heidelberg, **T. Sasaki** - Tokio, **B. Sbarsky** - Moskau, **A. Scheunert** - Leipzig, **E. Schmitz** - Breslau, **S. P. L. Sörensen** - Kopenhagen, **H. Steenbock** - Madison, **W. Straub** - München, **U. Suzuki** - Tokio, **K. Thomas** - Leipzig, **F. Verzár** - Basel, **A. I. Virtanen** - Helsingfors, **O. Warburg** - Berlin, **H. J. Waterman** - Delft, **G. v. Wendt** - Helsingfors, **E. Widmark** - Lund, **N. Zelinsky** - Moskau

herausgegeben von

W. Grassmann

Dresden

285. Band

Berlin

Verlag von Julius Springer

1936

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn A.G., Braunschweig
Printed in Germany

Inhalt

Erstes bis zweites Heft

Ausgegeben am 20. April 1936

Seite

Brill, Josef. Über Senkung der Körpertemperatur bei Vögeln nach Einverleibung pyrogener Stoffe 1

Allers, Rudolf und **Josef Brill.** Über das Verhalten des Blutzuckers bei Tauben unter der Einwirkung einiger zentral angreifender Gifte . 6

Hatakeyama, Tatsuo. Über eine bisher nicht beschriebene experimentelle Hyperlipämie bei Kaninchen, zugleich ein Beitrag zur Erkenntnis der Genese der Aderlaßlipämie 11

Störmer, Inge. Follikelhormon und Blühtermin von Chrysanthemen 29

Lieben, Fritz und **Hans Jesserer.** Studien zur Biuretreaktion der Proteine 36

Chrząszcz, Tadeusz und **Józef Janicki.** Über die Vermehrung der aktiven Amylasemenge im ungekeimten Getreide durch Schwefelwasserstoff und Papain 47

Kapeller-Adler, Regine und **Georg Boxer.** Über arsenhaltige Azoproteine und über die Kuppelungsfähigkeit von Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit Diazobenzolarsinsäure . . 55

Maurer, Kurt und **Bruno Schiedt.** Das Verhalten der d-Araboascorbinsäure und des Vitamins C gegenüber Ferrosalzen 67

D'Alessandro, G. und **S. Petrucci.** Über den Einfluß einiger Fettsäuren auf die Blutglykolyse 72

Eisler, B., K. G. Rosdahl und **H. Theorell.** Über die Mikrobestimmung des Kupfers mit Hilfe der lichtelektrischen Photometrie 76

Lüdtke, Max. Zur Frage des Säurecharakters der Cellulose; zugleich eine Mitteilung über Oxydationsvorgänge an Membranstoffen . . 78

Seite

Wenig, Karel und **Jiří Joachim.** Der Einfluß des Insulins auf den Lymphzuckerspiegel bei der Seidenraupe (Bombyx mori) 98

Lasnitzki, A. Über den Einfluß der Kationen auf das Gärvermögen der Tumorzelle. VI. Mitteilung: Calcium und Magnesium (2. Teil) . . 101

Weber, L. I. und **Fritz Lederer.** Einfluß von ein- und mehrwertigen Alkoholen, sowie von Mono- und Polysacchariden auf die Flüssigkeitsaufnahme durch Gele 115

Kapeller-Adler, Regine. Bemerkung zur Arbeit „Franz Földes: Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin" 123

Hinsberg, K. Über die Bestimmung der Hydroxylzahl von Oxyfettsäuren 125

Barrenscheen, H. K. und **Herbert Prinz.** Über Melanogen und Melanin 130

Roughton, F. J. W. Bemerkungen zu einer Arbeit von G. Groscurth und R. Havemann über Carb-Hämoglobin 150

Groscurth, G. und **R. Havemann.** Entgegnung auf die vorstehende Bemerkung F. J. W. Roughtons zu unserer Arbeit über Carb-Hämoglobin 153

Warburg, Otto und **Walter Christian.** Gärungs-Co-Ferment aus roten Blutzellen 156

Drittes bis viertes Heft

Ausgegeben am 12. Mai 1936

Kylin, Eskil und **Friedrich Paulsen.** Der isoelektrische Punkt des Fibrinogens 159

Werle, E. und **J. Hürter.** Über Ornitho-Kallikrein. I. Mitteilung über kreislaufaktive Substanzen der Vögel 175

Ludány, G. v. Die Wirkung der ultravioletten Strahlung auf das Villikinin 192

Pfeiffer, G., unter Mitarbeit von **L. Clarenz.** Die analytische Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futtermitteln . . . 195

Wöhlisch, Edgar und **Alfons Kiesgen.** Untersuchungen über das viskosimetrische Verhalten des Fibrinogens. 200

Theorell, Hugo. Reines Cytochrom c. II. Mitteilung: Darstellung, Eigenschaften, Ionenbeweglichkeit, Diffusion und Absorptionsspektrum des Cytochroms c 207

Seite

W. Braun und **A. Frey.** Stoffwechseluntersuchungen von Aspergillus niger. I. Mitteilung: Einfluß von Phytin auf Stoffwechselvorgänge von Aspergillus niger 219

Ciaranfi, Enrico. Über den Abbau der Buttersäure durch überlebende Leberschnitte 228

— Bemerkung zur Bestimmung des respiratorischen Quotienten von Gewebsschnitten in Phosphatringer 238

Nord, F. F., Else Dammann und **Heinrich Hofstetter,** mit Versuchen von **Vera Senftner** und **Elfriede Rosdorff.** Ist bei der alkoholischen Zuckerspaltung in der Zelle die Phosphorylierung zwangsläufig? Beitrag zur Biochemie von fusarium lini B. I. Mitteilung: (13. Mitteilung zum Mechanismus der Enzymwirkung 241

Haugaard, G. und **Erling Lundsteen.** Über die Messung des p_H im Blute mit Hilfe der Glaselektrode 270

Myrbäck, Karl und **Signe Myrbäck.** Über freie und gebundene Amylase in der Gerste 282

Myrbäck, K. Zur Kenntnis der Stärkespaltung durch pflanzliche Amylasen. I. 290

Földes, Franz. Erwiderung auf die Bemerkungen von Kapeller-Adler über meine in dieser Zeitschrift **283**, 199, 1936 erschienene Arbeit 294

Kapeller-Adler, Regine. Schlußbemerkung zur Arbeit: „Franz Földes, Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin“ 296

Karrer, Paul und **Otto Warburg.** Jodmethylat des Nicotinsäureamids 297

Fünftes bis sechstes Heft

Ausgegeben am 6. Juni 1936

Benedict, J. und **G. Mayer.** Einfluß der Ketonkörper auf die Serumlipase 299

Giri, K. Venkata. Über Speichel-Phosphatase. 306

Barth, H. Physikalische Versuche zum Problem der mitogenetischen Strahlung 311

Chrząszcz, Tadeusz und **Mikołaj Zakomorny.** Die Bedingungen der biochemischen Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze 340

— — Über die Bedeutung der Äpfelsäure bei der Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze 348

Seite

Laszt, L. und **F. Verzár.** Beeinflussung der Fettwanderung durch Jodessigsäure und Nebennierenexstirpation 356

Haas, Erwin. Mikrohydrierung mit Hydrosulfit 368

Bloch, K. Über phosphorhaltige Lipoide aus humanen Tuberkelbazillen 372

Nilsson, Ivar. Zur Bestimmung von Glucosamin in Proteinstoffen 386

Zakrzewski, Z. und **Hans J. Fuchs.** Beitrag zur Mikrostickstoffbestimmung nach Kjeldahl 390

Pantschenko-Jurewicz, W. v. und **H. Kraut.** Über Struktur und Eigenschaften der Esterasen. II. Mitteilung: Ein Zusammenhang zwischen Ascorbinsäure und Leberesterase 407

Geness, S. G. und **W. P. Komissarenko.** Über die physiologischen Schwankungen des Blutzuckerspiegels bei Kaninchen und Hunden 420

Hofmann, E. Zur Spezifität der Glykosidasen 429

Schuchardt, Werner. Über die Phosphatasen von Hefe 448

Autorenverzeichnis 457

Über Senkung der Körpertemperatur bei Vögeln nach Einverleibung pyrogener Stoffe.

Von

Josef Brill.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Januar 1936.)

Es ist immer der Mühe wert festzustellen, ob eine bei gewissen Lebewesen beobachtete Reaktion zu den allgemeinen Eigenschaften des Lebendigen überhaupt gehört, oder nur bestimmten Arten eigentümlich ist. Wir kennen verschiedene Stoffe, welche bei den Säugetieren zumeist eine Steigerung der Körpertemperatur erzeugen. Wir fanden, daß bei Vögeln die umgekehrte Wirkung, ein Temperaturabfall, eintreten kann.

Methodik.

Bei den an Tauben und Hühnern angestellten Versuchen wurde die Körpertemperatur teils thermoelektrisch, teils mit dem Quecksilberthermometer gemessen. Messungen an der Körperoberfläche, über dem Brustbein, unter den Flügeln, erwiesen sich als zu sehr abhängig von der Außentemperatur und anderen Nebenumständen, weswegen nur die in der Kloake erhaltenen Werte verwendet werden. Die Tiere befanden sich in Rücken- (sog. „Narkose"-) Lage. Jede Messung beanspruchte etwa 2 Minuten; nach dieser Zeit wurde weiteres Ansteigen nicht beobachtet. Von einer Narkose wurde, etwaiger Nebenwirkung wegen[1], abgesehen.

Zugeführt wurden: Tetrahydro-β-Naphthylamin (abgekürzt TN.), als Chlorhydrat, in jedesmal frisch bereiteter Lösung, mittels intramuskulärer Injektion, ferner Kokain, Coffein, Chinin und Milch.

Im allgemeinen wurde an jedem Tier nur ein Versuch vorgenommen; nur zu den Versuchen 11 und 15 dienten Tiere, die schon zuvor eine Injektion erhalten hatten.

Ergebnisse.

Injektionen von Tetrahydro-β-Naphthylamin erzeugen bei Tauben und Hühnern regelmäßig einen Temperaturabfall. Über die erhobenen Werte und die zugeführten Giftmengen gibt die Tabelle Aufschluß.

Die ersten vier, in die Tabelle nicht aufgenommenen Versuche, wurden mit Mengen von 0,02, 0,03, 0,05 und 0,1 g vorgenommen. Dabei traten krampfartige Zuckungen, schwere Gleichgewichtsstörungen mit nachfolgenden Ermattungszuständen auf. Mit 0,1 g, d. i. etwa 0,4 g pro kg, ist die tödliche Dosis erreicht. Bei den überlebenden Tieren lag übrigens noch nach $2^1/_2$ Tagen die Temperatur um etwa 2^0 unter der vor dem Versuch gemessenen.

[1] Vgl. *Allers* u. *Hochstädt*, Zeitschr. f. exper. Med. **70**, 221, 1930.

Tabelle.

Versuch Nr.	Dosis in g	Temperatur nach 0 Min.	30 Min.	60 Min.	90 Min.	Tiefste Temperatur	Zeit in Min. bis Erreichung der tiefsten Temperatur	Größte Temperaturdifferenz
				Tauben.				
5	0,01	41,2	39,6	38,3	38,3	38,3	90	2,9
6	0,02	40,6	37,6	36,4	37,0	36,4	60	4,2
7	0,03	41,0	37,6	36,4	35,2	34,0	140	7,0
8	0,04	41,2	39,4	39,3	38,4	38,4	90	2,8
9	0,05	41,0	37,6	35,6	35,8	35,2	140	5,8
10	0,06	41,8	†	—	—	—	—	—
11	0,06	40,2	38,9	37,4	38,2	37,4	60	2,8
12	0,07	41,4	40,3	38,8	39,7	38,4	50	3,0
13	0,07	40,8	†	—	—	—	—	—
14	0,1	40,8	†	—	—	—	—	—
15	0,07	37,2	†	—	—	—	—	—
16	0,001	40,8	38,8	38,1	37,6	37,6	70	3,2
17	0,0001	40,8	40,5	—	40,4	40,4	20	0,4
18	0,001	40,7	40,1	40,2	40,1	40,1	100	0,6
19	0,001	42,6	40,2	—	39,1	39,1	50	3,5
				Hühner.				
20	0,001	40,2	40,2	40,2	—	40,2	—	0,0
21	0,01	40,6	40,0	40,2	40,6	39,6	20	1,0
22	0,06	41,0	37,2	37,8	38,2	37,2	30	3,8
23	0,1	40,6	38,0	38,8	39,0	37,8	40	2,8
24	0,1	40,7	37,0	38,0	38,0	36,8	40	3,9
25	0,2	40,6	37,8	36,0	35,8	35,4	100	5,2
26	0,4	40,6	36,8	†	—	—	—	—

Bei kleineren Mengen zeigen sich Erscheinungen, die man vielleicht am besten als solche der Unruhe und des Unbehagens bezeichnen kann: Schüttelbewegungen des Kopfes, Entfalten der Flügel ohne Ansatz zu Flugbewegungen, unruhiges Trippeln, Stehen bald auf dem einen, bald auf dem anderen Bein. Ferner beobachtet man: Vornüberfallen auf den Kopf, Schwanken ohne völligen Verlust des Gleichgewichts. 0,03 g rufen bereits schwerste Störungen des Gleichgewichts hervor; 5 Minuten nach der Injektion vermag das Tier nicht mehr sich auf den Beinen zu halten, es liegt am Boden und macht vergebliche Versuche, sich aufzurichten; nach 10 Minuten hat es auch die Fähigkeit verloren, sich aus der Rückenlage umzudrehen, andeutungsweise treten Krämpfe auf. Bei stärkerer Vergiftung (0,04 g) sieht man das Tier in den ersten Minuten herumtorkeln, als ob es berauscht wäre, es läuft „blind" in Hindernisse hinein. Ob in der Tat Sehstörungen im Spiele waren, konnte nicht entschieden werden. Gelegentlich beobachtet man auch völlige, an Apathie gemahnenden Ruhe; so fehlten im Versuch 9 (0,05 g) alle Unruheerscheinungen. Vielleicht hängt der hier gefundene besonders große Temperatursturz von 5,8° mit dieser Abwesenheit aller motorischen Unruhe zusammen.

Tetrahydro-β-Naphthylamin vermag in einer Menge von 0,001 g einen einwandfreien Temperaturabfall hervorzurufen (Versuche 16, 18, 19). Die sehr geringfügige Temperatursenkung von 0,4° nach Zufuhr

von 0,0001 g dürfte aber eher als Schockwirkung aufzufassen sein, da sich auch nach Einspritzung von destilliertem Wasser solche Werte finden ließen.

Bei den Hühnern beobachteten wir Unruhe, Sträuben der Halsfedern, Beschleunigung der Atmung bis 216 Atemzüge, Salivation, Opisthotonus. Bei tödlichen Mengen: rasch fortschreitende Mattigkeit und Übergang in Erschöpfung.

Erörterung der Versuche.

Da der Schock der Injektion eine nur ganz geringe Temperatursenkung erzeugt, muß der nach Zufuhr von TN. beobachtete Abfall als eine spezifische Wirkung dieses Giftes angesehen werden.

Soweit uns bekannt, liegen nur sehr wenige Angaben über die Wirkung von TN. auf Vögel vor. *H. Schut*[1] berichtet über 25 Versuche an Hühnern. Er verzeichnet zweimal einen Temperaturanstieg, und zwar bei Tieren, welche schnell der Vergiftung erlagen. Auch wir haben gelegentlich (Versuch 13) einen prämortalen Temperaturanstieg beobachtet. Indes hat *Schut* die erste Messung 30 Minuten nach der Injektion vorgenommen; nach dieser Zeit fanden wir regelmäßig Temperatursenkung. *Schut* meint, daß der Vorrat an Leberglykogen und der Blutzuckerspiegel von Einfluß seien (vgl. die folgende Mitteilung), ferner auch das Geschlecht, da die beiden Tiere mit Temperaturanstieg Hähne waren.

Nach *Schut* soll die Hyperthermie gewissermaßen an die Stelle der Glykosurie treten, die sich sonst einstellte und in jenen zwei Fällen ausblieb. Wir haben Hähne nicht untersucht; der Ernährungszustand der Versuchstiere war, mit Ausnahme des Tieres Nr. 15, ein sehr guter. Der Widerspruch zwischen den Angaben *Schut*s und unseren Befunden bleibt einstweilen unaufgeklärt.

W. R. Hess[2] hat als Nebenbefund bei seinen Untersuchungen über Avitaminose eine Temperatursenkung nach TN. sowohl bei „Reistauben" als bei gesunden Kontrolltieren verzeichnet, ohne sich über Entstehung und Gesetzmäßigkeit der Erscheinung auszusprechen. Nach intramuskulärer Verabfolgung von 0,01 g fand *Hess* eine Temperatursenkung von 1,3° bei einer Reistaube, eine von 3,6° bei einem gesunden Tier. Diese Angaben stehen mit unseren Erfahrungen in Einklang.

Nach *C. Kayser*[3] soll die Wärmeregulation bei Vögeln im großen und ganzen denselben Gesetzen gehorchen wie die bei den Säugern. Die mitgeteilten Befunde lassen eine Ausnahme erkennen. Um festzustellen, ob diese nur für das TN. gelte, wurden Versuche mit Cocain vorgenommen. 0,05 g Cocain ruft bei Tauben eine Temperatursenkung bis zu 5° hervor.

[1] Arch. intern. Pharm. **24**, 447, 1914—1918. — [2] Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **163**, 378, 1924. — [3] Ann. de Phys. **5**, 131, 1929.

Coffein — 0,025 als Coffein. natrio-benzoic. — bewirkte einen Temperaturabfall von 2°. Chinin, 0,25 g als Chlorhydrat, hatte keine Wirkung. Nach Injektion von 1 ccm Milch kam es zwar nicht zu einem Temperaturabfall, aber auch zu keiner Steigerung.

Schon *L. v. Krehl*[1] hat gefunden, daß Aufschwemmungen von Bakterien bei Tauben und Hühnern keine Temperaturerhöhung erzeuge, vielmehr ein Absinken bewirke. *Krehl* erwähnt, daß er außer einer Angabe von *Diem*[2] keine Mitteilung über Fieber bei Vögeln habe finden können. Schon seit *Lauder-Brunton* und *Cash* ist bekannt, daß es ungewöhnlich großer Gaben von Opium oder Morphium bedarf, um bei Vögeln einen Temperaturabfall hervorzurufen[3].

Die vegetativen Reaktionen des Vogelorganismus dürften sich auch noch in anderer Hinsicht von denen der Säuger unterscheiden. So bemerkt *Trendelenburg*[4], daß der Extrakt des Hypophysenhinterlappens bei intramuskulärer Einspritzung eine starke und anhaltende Blutdrucksenkung auslöse, die durch Atropin oder durch Vagotomie nicht aufgehoben werde.

Aber auch bei Säugetieren kommen bemerkenswerte Abweichungen von der durchschnittlichen Regel vor. Schon *v. Krehl* hat beobachtet, daß der Igel sich gegen pyrogene Stoffe wie die Vögel verhalte (s. oben). Ferner hat *E. P. Pick* festgestellt, daß Meerschweinchen nach TN.-Injektion (1,5 bis 3,0 mg pro kg) eine Temperatursenkung zeigen, welche nach 2 bis 3 Stunden 2 bis 3° ausmacht. Wenn aber diesen Tieren Thyroxin verabfolgt wird, so erzeugt die Injektion von TN. eine geringfügige Temperatursteigerung; zugleich aber entfaltet der unter normalen Bedingungen harmlose Stoff schwerste Giftwirkungen. Ähnlich verhalten sich Kaninchen gegenüber Cocain[5]. Diese letztgenannten Versuche zeigen, daß offenbar die Wärmeregulation mit dem hormonalen Gleichgewicht in einem engen Zusammenhang steht, oder wenigstens bei manchen Tieren stehen kann. Die Art der obwaltenden Beziehungen ist derzeit noch nicht zu durchschauen. Auch ist nicht zu sagen, ob das „inverse" Verhalten des Vogelorganismus gegen die von uns untersuchten Stoffe auf Eigenartigkeiten gerade der hormonalen Regulationen beruhe. Fest steht nur, daß sich bei Tauben und Hühnern ein von dem bei den meisten Säugern beobachteten verschiedenes Verhalten beobachten ließ.

Zusammenfassung.

1. Intramuskuläre Injektion von Tetrahydro-β-Naphthylamin erzeugt bei Hühnern und Tauben regelmäßig einen Temperaturabfall

[1] Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **35**, 227, 1895. — [2] Monatshefte f. prakt. Tierheilkde. **3**. — [3] Festschr. f. *C. Ludwig*, Leipzig 1887. — [4] Die Hormone, Berlin 1929, S. 142; vgl. auch die dort genannten Arbeiten von *D. N. Paton* u. *A. Watson*, J. of Phys. **44**, 413, 1912; *L. T. Hogben* u. *W. Schlapp*, J. of exper. Physiol. **14**, 229, 1924. — [5] Deutsch. med. Wochenschr. 1931, Nr. 36, S. 1532.

von durchschnittlich 3 bis 3,5°, bis maximal 5,8°, der anfangs rasch sich vollzieht, nach 1 bis $1^1/_2$ Stunden den tiefsten Stand erreicht und dann allmählich wiederum schwindet.

2. Bei stärkerer Vergiftung besteht auch noch nach $2^1/_2$ Tagen eine niedrigere Körpertemperatur.

3. Nur ein einziges Mal wurde, prämortal, ein Temperaturanstieg beobachtet.

4. Zwischen Giftmenge und Temperaturabfall besteht kein strenger Parallelismus. Offenbar spielen noch andere Momente mit, etwa die Stärke der motorischen Reizerscheinungen.

5. Vergiftung mit Tetrahydro-β-Naphthylamin bewirkt: Salivation, Beschleunigung der Atmung, Gleichgewichtsstörungen, Opisthotonus, Pendelbewegungen des Kopfes, tonisch-klonische, zuweilen auch Rollkrämpfe bei tödlichem Ausgang, schwere Erschöpfung, in leichteren Fällen motorische Unruhe und rauschartige Zustände.

6. Kokain und Coffein bewirken gleichfalls Temperatursenkung; nach Injektion von Milch tritt keine Temperaturerhöhung ein.

Über das Verhalten des Blutzuckers bei Tauben unter der Einwirkung einiger zentral angreifender Gifte.

Von

Rudolf Allers und **Josef Brill.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Seegen-Stiftung der Akademie der Wissenschaften zu Wien.)

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Januar 1936.)

Wie in der vorangehenden Mitteilung ausgeführt wurde, hat *Schut*[1] vermutet, daß zwischen dem Verhalten der Körpertemperatur nach Zufuhr von Tetrahydro-β-Naphthylamin und dem Kohlenhydratvorrat (Leberglykogen, Blutzucker) ein Zusammenhang bestehe. Er fand denn auch bei Hühnern ein Sinken des Blutzuckerspiegels nach Injektion von Tetrahydro-β-Naphthylamin (TN.). *van Uytvanck*[2] beobachtete bei Tauben Hypoglykämie und Hyperthermie nach Vergiftung mit Dinitro-α-Naphthol. *W. Ellis* und *V. W. Barlow*[3] erhielten bei intraperitonealer Darreichung von Medinal bei Tauben — übrigens auch bei Katzen — Hyperglykämie. Andere Angaben über das Verhalten des Blutzuckers bei Vögeln nach Vergiftung sei es mit TN., sei es mit Narkoticis, sind uns nicht bekannt geworden.

Wir haben Tauben Blut aus der Flügelvene entnommen, teils mit, teils ohne Narkose, und zwar immer in den Vormittags- und Nachmittagsstunden, zu welcher Zeit nach *Krasnjansky* und *Dsikovsky*[4] sich der Blutzuckerspiegel nicht ändert. Der Zuckergehalt wurde nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt. Die Gifte wurden intramuskulär injiziert. Die Körpertemperatur wurde durch Messung in der Kloake bestimmt. Es wurde Blut je vor dem Versuch und zur Zeit des Eintritts deutlicher Giftwirkung entnommen.

Amytal (Iso-amyl-äthylbarbitursäure, von Eli Lilly & Co., Indianopolis, USA.), in Dosen von 0,02 g stets frisch bereiteter und vor Luft geschützter Lösung, hat bei einmaliger Zufuhr nur eine geringe Wirkung auf den Blutzuckerwert (Versuch 1 bis 4), dagegen eine deutlich steigernde Wirkung, wenn die Injektion nach etwa $1^1/_2$ Stunden wiederholt wird (Versuch 5 und 6). *Morphium* (0,02 g) erzeugt eine starke Hyperglykämie (Versuch 7 und 8). *Urethan* bewirkt nur eine geringfügige Zunahme des Blutzuckers (Versuch 9 und 10).

Chloralhydrat steigert den Zuckergehalt des Blutes (Versuch 11 und 12). *Paraldehyd* (Versuch 13 und 15) bewirkt dagegen ein merkliches Absinken.

---

[1] Arch. internat. Pharmacodyn. **24**, 133, 1914—1918. — [2] Ebenda **41**, 160, 1931. — [3] J. Pharm. and exper. Ther. **24**, 259, 1924. — [4] Diese Zeitschr. **137**, 282, 1931.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Tiergewicht g	Narkose	Temperatur vor Narkose	Blutzucker vorher	Temperatur vor 2. Narkose	Temperatur nach 2. Narkose	Blutzucker nachher	Veränderung des Blutzuckerwertes
1	360	Amytal	40,4	231	38,8	39,2	222	— 9
2	280	„	41,4	190	40,2	40,2	201	+ 11
3	320	„	42,0	212	41,6	40,8	239	+ 17
4	300	„	41,0	182	41,5	41,4 41,0	170	— 12
5	400	„	41,4	195	—	40,8	248	+ 53
6	310	„	41,2	193	—	40,8	230	+ 37
7	230	Morphium	41,0	248	40,4	39,6 40,2	313	+ 65
8	300	„	41,6	248	40,0	39,4 39,2	314	+ 66
9	250	Urethan	41,4	216	39,6	38,8 38,2	252	+ 36
10	325	„	41,4	176	40,0	38,8	194	+ 18
11	400	Chloral	41,0	192	39,4	38,0	248	+ 56
12	245	„	40,8	190	39,4	36,6	211	+ 21
13	290	Paraldehyd	41,8	253	38,6	39,6	232	— 21
14	210	—	42,4	194	39,2	39,7	172	— 26
15	210	—	42,4	219	38,6	37,0 35,4 †	166	— 53

Tabelle II.

Versuch Nr.	Tiergewicht g	Temperatur vor Narkose	Amytal g	Blutzucker	Temperatur vor TN.	TN. g	Temperaturen nach 15 Min.	30 Min.	45 Min.	60 Min.	Temperaturdifferenz	Blutzuckerdifferenz
20	250	41,0	0,02	184	40,2°	0,002	40,0	39,4	39,4	38,6	1,6	+ 38
21	300	41,2	0,02	197	41,2	0,003	41,0	39,4	38,9	38,4	2,8	± 0
22	300	41,4	0,02	197	40,0	0,004	38,8	38,6	38,4	38,2	1,8	+ 32
23	275	41,8	0,02	219	41,2	0,004	40,6	39,6	38,7	38,0	3,2	+ 53
24	435	41,6	0,02	204	41,4	0,004	40,6	39,0	38,6	37,6	3,8	+ 37
						Hungertiere.						
25	255	41,6	0,02	254	41,2	0,003	39,2	38,2	37,8	36,8	4,4	+ 65
26	260	41,6	0,02	220	40,6	0,003	39,2	38,0	37,7	37,8	2,8	+ 33
27	290	41,0	0,02	222	40,6	0,004	38,8	37,4	37,7	37,6	3,4	+ 42
28	375	40,6	0,02	216	40,8	0,004	38,5	37,2	36,0	35,2	5,6	+ 98
29	320	42,2	—	182	42,2	0,004	39,0	38,0	37,2	36,8	5,4	+ 137
30	270	41,0	—	177	41,0	0,003	39,6	38,0	37,3	37,2	3,8	+ 121

Kontrollversuche mit Einspritzung von reinem Wasser oder bloßem Einstich ohne Injektion ergaben, daß eine etwaige Schockwirkung durchaus vernachlässigt werden könne. Weder der Zuckerwert noch die Körpertemperatur zeigten nennenswerte Schwankungen.

In fünf Versuchen wurde neben einem Narkoticum auch TN. zugeführt. Dabei ergab sich viermal ein Temperaturabfall und zugleich eine Steigerung des Zuckergehalts, einmal unterblieb aber diese, während die Temperatur um 2,8° sank. Bei hungernden (durch dreimal 24 Stunden) Tieren war unter diesen Bedingungen die Hyperglykämie ausgeprägter als bei gut ernährten. Eine besonders starke Zunahme des Blutzuckers

zeigte sich, wenn das TN. ohne gleichzeitige Verabfolgung eines Narkoticums gegeben wurde (Versuch 29 und 30).

Wie in den in der voranstehenden Mitteilung niedergelegten Versuchen zeigt sich auch in diesen, daß verschiedene Tiergattungen sich gegenüber Giften sehr verschieden verhalten können und daß auch zwischen chemisch einander nahestehenden Substanzen — wie es das Chloralhydrat und der Paraldehyd sind — wesentliche Unterschiede vorkommen.

An Säugern hat man festgestellt, daß manche Narkotica überhaupt den Blutzuckerwert unbeeinflußt lassen, daß andere eine steigernde, andere wiederum eine herabsetzende Wirkung entfalten[1]; von einem einheitlichen Mechanismus kann kaum die Rede sein[2]. Amytal soll nach *Handovsky* den Blutzucker unbeeinflußt lassen, nach anderen[3] gelegentlich Hyperglykämie erzeugen. Wir sahen, daß bei Tauben allerdings eine einmalige Darreichung keine Veränderung des Zuckerwertes herbeiführt, daß aber Wiederholung einen Anstieg bewirkt. Auffallend aber ist demgegenüber, daß die an sich nicht wirksame Dosis zusammen mit TN. doch irgendwie einen Einfluß ausübt, da die hyperglykämisierende Wirkung des TN. entschieden stärker ist, wenn man von der Amytalnarkose Abstand nimmt. Man kann kaum einfach eine herabsetzende Wirkung des Amytals annehmen, weil ja sonst doch wohl, wenigstens ab und zu, eine Hypoglykämie nach Verabfolgung dieses Stoffes hätte beobachtet werden müssen. Es kann sich daher nur um das Eintreten einer komplizierten Wechselwirkung der beiden Gifte handeln.

Nach *Steinmetzer* und *Swoboda* bewirkt Morphium bei Säugern eine Vermehrung des Blutzuckers, nach *Löwy*[4] ist es ohne Einfluß. Wir fanden bei Tauben regelmäßig Hyperglykämie.

Hinsichtlich des Urethans und des Chloralhydrates verhielten sich unsere Versuchstiere wie die Säuger. Auch von diesen ist eine auf diese Stoffe hin auftretende Hyperglykämie bekannt. Paraldehyd aber gilt als blutzuckervermehrend bei Säugern, während wir das Eintreten einer merklichen Hypoglykämie beobachten konnten.

Das TN. bewirkt auch ohne Narkose einen Temperaturabfall und ein Ansteigen der Blutzuckerwerte (um etwa 30 mg-%). Übrigens wirkt die Einspritzung von TN. narkoseabkürzend, worauf schon *Jonescu*[5] hingewiesen hat. Auch hierin zeigt sich an, wie kompliziert

---

[1] *K. Steinmetzer* u. *F. Swoboda*, diese Zeitschr. **198**, 239, 1928. — [2] *Samsem* u. *Woogyate*, J. of biol. Chem. **21**, 1, 1915. — [3] *S. Weiss*, Proc. Soc. exp. Biol. **23**, 363, 1926; *Kinis*, *Boyd* u. *Lesse*, Amer. J. of Phys. **76**, 293, 1926. — [4] Zentralbl. f. inn. Med. **42**, 713, 1923. — [5] Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **60**, 345, 1909.

die Wechselwirkung zwischen diesem Stoffe und den Narkoticis sein muß.

Schut hat nun bei Tauben die Hyperglykämie nach Injektion von TN. vermißt und bei Hühnern sogar eine Hypoglykämie gefunden; letztere sollen Glykosurie zeigen, die nach *Schut* an die Stelle einer Hyperglykämie träte. Abgesehen davon, daß uns diese Auffassung nicht recht einleuchten will, stehen unsere Befunde an Tauben zu denen *Schuts* in deutlichem Widerspruch.

Wir fanden eine Temperaturabnahme mit einer Zunahme des Blutzuckers vergesellschaftet, ohne einen Parallelismus zwischen diesen beiden Erscheinungen untereinander und der verwendeten Giftmenge feststellen zu können. Haben wir es mit einer spezifischen Wirkung des TN. zu tun? Auch Narkose allein kann eine beträchtliche Hyperglykämie erzeugen, ihr Einfluß auf die Körpertemperatur aber ist viel geringer. TN. bewirkt eine Abnahme der Körpertemperatur, die nahezu durchschnittlich das Dreifache der bei Narkose zu beobachtenden beträgt. Die Hypothermie nach TN. muß wohl als eine spezifische Wirkung des Giftes angesehen werden. Fraglich ist es, wie der Zusammenhang zwischen der Veränderung der Temperatur und der des Blutzuckerwertes aufzufassen sei. Man könnte daran denken, daß die Temperatursenkung eine Adrenalinausschwemmung und damit eine Vermehrung des Blutzuckers nach sich zöge. *Bouckaert* und *Heymans* haben auch dem TN. selbst adrenalinartige Wirkungen zugeschrieben[1], während *Jonescu* eine solche in Abrede stellt. Lägen die Dinge bei den Vögeln ebenso wie bei den Säugetieren, so wäre wohl auch an die sonstigen Zusammenhänge zwischen Körpertemperatur und Blutzuckerwert zu denken[2]. Da sich aber hier ganz andere Verhältnisse zeigen, ist eine einfache Übertragung der an Säugern gewonnenen Einsichten unstatthaft.

Auch andere Angaben *Schuts* konnten von uns nicht bestätigt werden. Versuche an Hungertieren, die aber keinerlei Störungen erkennen ließen, ergaben noch höhere Zuckerwerte als die an den normalen angestellten. Bei Beurteilung dieser Versuche ist übrigens die Angabe *Martinos* zu berücksichtigen[3], derzufolge hungernde Tauben eine höhere Bereitschaft zu Hyperglykämie besitzen. Allerdings ist zu bedenken, daß auch *Averbuck*[4] bei der Taube noch nach 24 Stunden hinlängliche Nahrungsreste in Kropf und Magen zurückbleiben, so daß die eigentliche Zeit der Nahrungslosigkeit kürzer anzusetzen ist.

Man nimmt gemeinhin an, daß zwischen Hyperthermie und Hyperglykämie, wenn schon kein Parallelismus, so doch ein gleichsinniger

[1] Arch. internat. de Pharmacodyn. **35**, 137, 1929. — [2] Vgl. *K. Schwarz* u. *K. Hinrich*, diese Zeitschr. **194**, 341, 1928. — [3] Boll. Ital. Biol. sper. **2**, 316, 1927. — [4] Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **157**, 342, 1930.

Zusammenhang bestehe. In unseren Versuchen erscheint indes Temperaturabfall mit einem Ansteigen des Blutzuckerwertes gekoppelt.

Es erscheint uns verfrüht, aus diesen Befunden irgendwelche theoretischen Folgerungen ableiten oder eine Erklärung versuchen zu wollen. Es steht unseres Erachtens einstweilen nur fest, daß der Organismus der Taube sich in vieler Hinsicht anders verhält, als dies von den Säugern her bekannt ist. Auch die Verschiedenheit der Wirkung der einzelnen Narkotica, vor allem des Paraldehyds, glauben wir nicht deuten zu dürfen. Weitere systematische Untersuchungen werden erforderlich sein, um in die hier vorliegenden Verhältnisse einiges Licht zu tragen.

Zusammenfassung.

Intramuskuläre Einspritzung von Tetrahydro-β-Naphthylamin bewirkt bei Tauben zusammen mit einem Abfall der Körpertemperatur ein Ansteigen des Blutzuckers. Diese Wirkung wird durch Amytalnarkose beeinträchtigt. Es tritt aber auch nach manchen Narkoticis — Morphium, Urethan, Chloralhydrat — eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels ein. Amytal entfaltet diese Wirkung erst nach zweimaliger, durch eine längere Zwischenzeit getrennter Verabreichung. Paraldehyd erzeugt eine Hypoglykämie. Die blutzuckersteigernde Wirkung ist im Hungerzustand stärker.

Über eine bisher nicht beschriebene experimentelle Hyperlipämie bei Kaninchen, zugleich ein Beitrag zur Erkenntnis der Genese der Aderlaßlipämie.

Von

Tatsuo Hatakeyama.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Sendai.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1935.)

Boggs und *Morris* (1) haben über die durch Aderlaß oder Äthylphenylhydrazininjektion hervorgerufene Hyperlipämie bei Kaninchen und *Morawitz* und *Pratt* (2) über eine solche durch Phenylhydrazinanämie verursachte berichtet; die erstgenannten Autoren führten diese Hyperlipämie auf die Verminderung des Serumeiweißes oder auf Oxydationsmangel infolge des Erythrocytenverlustes zurück, während die letztgenannten Autoren Sauerstoffmangel als Ursache angaben.

Seitdem haben viele Autoren dieses Problem durch verschiedene Untersuchungen zu klären versucht. *Milne* (3), *Saito* (4) und *Schmitz* und *Koch* (5) meinen, daß die Entstehung der Aderlaßlipämie auf die Verminderung der Erythrocyten bzw. des Hämoglobingehalts zurückzuführen sei. *Mill* (6) nimmt an, daß bei der Entstehung der anämischen Hyperlipämie außer der Verminderung des Hämoglobingehalts auch die Zentralnerven eine gewisse Rolle spielen.

Sakai (7) und *Horiuchi* (8) wiesen bei der Aderlaßlipämie des Kaninchens eine Verminderung des Serumlipasengehalts nach und schrieben dieser die Ursache der Hyperlipämie zu. *Feigl* (9) zeigte, daß bei Menschen 1 bis 2 Tage nach großem Blutverlust und bei Kaninchen nach Entziehung von 50 ccm Blut Hyperlipämie auftritt und unterstützte hiermit die Theorie von *Horiuchi*. *Tsuda* (10) gab an, daß die Ursache der Aderlaßlipämie nicht immer in der Erythrocytenverminderung zu suchen ist, während sich bei dieser Erscheinung immer das Serumeiweiß und die Serumlipase vermindern. *Edelmann* (11), *Dörle* (12), *Eichholz* (13), *Saito* (4) und *Nagashima* (14) sprechen sich gegen die Theorie der Lipasenverminderung aus; ebenso *Rix* und *Müller* (15), die beweisen konnten, daß durch langandauernde Fettfütterung bei Kaninchen eine alimentäre Hyperlipämie zutage tritt, und daß dabei der Serumlipasengehalt unverändert bleibt. Nach *Jastrowitz* (16) ist die Hyperlipämie, die durch verschiedene hämolytische Gifte oder durch Aderlaß herbeigeführt wird, eine Kompensationserscheinung des Organismus gegen die Herabsetzung des kolloid-osmotischen Druckes. Auch *Arthur* und *Ella Fischberg* (17) sind der Meinung, daß die Genese der Aderlaßlipämie mehr auf die Verminderung des Serumeiweißes als auf die der Erythrocyten zurückzuführen sei und daß ferner diese Erscheinung einen Kompensationsmechanismus des Organismus gegen die Herabsetzung des kolloid-osmotischen Druckes darstelle. Auf Grund einer Nachprüfung des *Fischberg*schen Versuchs unterstützen *Mauriac*, *Servantie* und *Demenier* (18) die Ansicht dieser Autoren. *Hecht Johansen* (19) dagegen wendet

sich gegen die Theorie des kolloid-osmotischen Druckes. *Lichtenstein* und *Epstein* (20) beobachteten bei zahlreichen Fällen von Nephrose und chronischer Nephritis eine Hyperlipämie, die zwar häufig, aber nicht immer von niedrigem Protein- bzw. Albumingehalt begleitet war.

Neuerdings hat *Starup* (21) die Meinung geäußert, daß die Aderlaßlipämie nichts mit dem Plasmaverlust zu tun hat. Nach seiner Ansicht ist ihre Genese nur in der ungenügenden Oxydation des Gewebes infolge der Erythrocytenverminderung zu suchen. Die Hyperlipämie, die durch Injektion von Phenylhydrazin oder von destilliertem Wasser, oder durch Halten der Tiere bei Sauerstoffmangel entsteht, soll nach seiner Untersuchung dieselbe Ursache wie die Aderlaßlipämie haben. Diese Hyperlipämien entstehen selbst nach dem Durchschneiden der Medulla spinalis (22), so daß hiernach die Meinung von *Mill* (6), daß die Zentralnerven bei der Entstehung der Aderlaßlipämie mitwirken, nicht zutreffend sein kann.

Vor ganz kurzem haben nun *Rosenthal*, *Friedländer* und *Kohn* (23) mitgeteilt, daß der Aderlaß bei Kaninchen trotz der nachfolgenden Reinjektion von Erythrocyten, Plasma oder sogar von Vollblut doch hochgradige Hyperlipämie hervorruft. Sie haben daraus den Schluß gezogen, daß die Ursache der Aderlaßlipämie im Mechanismus der Blutentziehung selbst liegt, daß nämlich die Blutentziehung die Störung des physikalisch-chemischen Gleichgewichts des Blutes zustande bringt, wodurch die Hyperlipämie verursacht wird.

Über die experimentelle Hyperlipämie gibt es noch eine Reihe von Untersuchungen (24) bis (28). In bezug auf die Genese der Aderlaßlipämie bzw. der Hyperlipämie bei durch hämolytische Gifte hervorgerufener Anämie gehen, wie schon auseinandergesetzt, die Meinungen immer noch weit auseinander. Es werden dabei folgende Theorien vertreten: die Theorie der Erythrocytenverminderung, der Serumeiweißverminderung, der Serumlipasenverminderung und die der Funktionsstörung des Nervensystems.

Um diese Frage zu klären, habe ich ebenfalls Versuche angestellt, in deren Verlauf die Erzeugung einer auffallenden Hyperlipämie auf eine bisher noch nicht beschriebene Weise gelungen ist. Um ihre Entstehungsweise zu erklären, wurde das Verhältnis der Erythrocytenzahl, des Hämoglobin- und Serumeiweißgehalts und der Nahrungsaufnahme bei dieser Hyperlipämie untersucht. Daran anschließend habe ich diese Hyperlipämie mit der Aderlaßlipämie verglichen und versucht, eine neue Erklärung in der Genese der Aderlaßlipämie zu finden.

Allgemeine Untersuchungsmethode.

Als Versuchstiere dienten männliche Kaninchen, die etwa einen Monat lang vor dem Versuche mit *Okara* (Bohnengallertrückstand) und Mohrrüben gefüttert und während dieser Zeit zu keinem anderen Zweck benutzt wurden. Ihr Körpergewicht wurde jeden Morgen vor dem Beginn der Fütterung festgestellt und um 9 und um 18 Uhr je eine Blutprobe entnommen. Von 10 bis 18 Uhr ließ man die Kaninchen ad libitum Okara und Rüben fressen und nahm dann das Futter bis zum nächsten Morgen weg.

Das Blut wurde in einer Menge von etwa 0,5 ccm mit einer Spritze aus der Ohrvene entnommen, in einem Mikrohämatokrit mit etwa 3 bis 4 mg reinem Natriumcitrat verrührt und dann 25 Minuten lang mit einer Touren-

zahl von 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Darauf las man das Volumprozent der Erythrocyten ab und führte mit 0,1 ccm Plasma die Bestimmung der Gesamtlipoide aus. Sonst wurde die Erythrocytenzahl nach *Thoma-Zeiss*, der Hämoglobingehalt nach *Sahli* und das Serumeiweiß mit dem Refraktometer nach *Pulfrich* gemessen.

Die Menge des täglich entnommenen Blutes überschritt im allgemeinen nicht 1,5 ccm, doch wurden nötigenfalls 2 bis 2,5 ccm Blut der Ohrvene oder eventuell auch der Jugularvene entnommen und mit 1,0 ccm Plasma die einzelnen Lipoidfraktionen analysiert.

Als Bestimmungsmethode für die Gesamtlipoide sowie für die Phosphatide, das freie Cholesterin, die Cholesterinester und die Neutralfette habe ich die Oxydationstitrationsmethode von *Katsura*, *Hatakeyama* und *Tajima* (29) angewandt.

Vorversuche.

Zuerst habe ich an 11 Kaninchen die Analyse der Plasmalipoide durchgeführt und an zwei Tieren verfolgt, ob irgendeine Veränderung am Gesamtlipoidgehalt des Plasmas durch eine tägliche Entnahme von 2 ccm Blut auftritt. Wie in Tabelle I ersichtlich, betragen die Gesamtlipoide des Blutplasmas bei den 11 Kaninchen 200 bis 400 mg-%, durchschnittlich 309 mg-%. Die Durchschnittswerte der einzelnen Lipoidfraktionen sind: Phosphatide 109 mg-%, freies Cholesterin 43 mg-%, Gesamtcholesterin 83 mg-%, Cholesterinester 65 mg-% und Neutralfette 92 mg-%.

Tabelle I. Plasmalipoid bei normalen Kaninchen.

Fälle	Körpergewicht kg	Phosphatide mg-%	Freies Cholesterin mg-%	Gesamtcholesterin mg-%	Verestertes Cholesterin mg-%	Cholesterinester mg-%	Neutralfette mg-%	Gesamtlipoide mg-%
Nr. 5	1,79	71	28	42	14	23	78	200
„ 10	2,00	116	28	46	18	29	190	363
„ 11	2,04	125	17	54	37	60	174	376
„ 14	2,15	159	41	107	66	107	43	350
„ 15	2,30	99	43	67	24	39	69	250
„ 16	2,33	112	59	82	23	37	123	331
„ 17	2,40	93	44	82	38	62	59	258
„ 18	1,87	87	50	90	40	65	46	248
„ 19	2,60	75	40	114	74	120	28	263
„ 20	2,59	142	47	121	74	120	91	400
„ 21	1,97	121	74	106	32	52	112	350
Durchschnittswert		109	43	83	40	65	92	309

Tabelle II zeigt, daß bei einem Kaninchen, dem man 12 Tage lang hindurch täglich 2 ccm Blut entnommen hatte, das Körpergewicht unverändert blieb und keine Trübung des Plasmas auftrat. Der Gesamtlipoidgehalt, die Erythrocytenzahl, der Hämoglobin-, und Serumeiweißgehalt zeigten ebenfalls nur ganz geringfügige Tagesschwankungen.

Tabelle II. Kaninchen Nr. 5, ♂. Gesamtlipoide des Blutplasmas bei Blutentnahme von täglich 2 ccm.

Datum	Körpergewicht kg	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %
5. XI.	1,59	36,0	—	206	4,75	92	6,12
7. XI.		34,1	—	179			
8. XI.	1,55	35,3	—	159			
9. XI.		27,0	—	173			
10. XI.	1,52	26,8	—	186	4,60	90	6,10
11. XI.		29,0	—	190			
12. XI.	1,46	35,2	—	190			
13. XI.		36,0	—	211			
14. XI.		33,5	—	207			
15. XI.	1,50	34,7	—	243	4,80	85	5,79
16. XI.		35,0	—	223			
17. XI.	1,50	36,8	—	230	4,93	88	6,44

Sauglipämie.

a) Entstehung der Sauglipämie.

Rosenthal (23) u. a. haben, wie oben erwähnt, mitgeteilt, daß die Reinjektion von Plasma, Erythrocyten oder sogar von Vollblut im Anschluß an den Aderlaß die Aderlaßlipämie nicht unterdrücken könne. Aus diesem Grunde nahmen sie an, daß die Aderlaßlipämie nicht infolge Mangels an Plasmaeiweiß oder Verminderung der Erythrocyten verursacht werde; die Genese der Aderlaßlipämie soll nach ihnen vielmehr im Mechanismus der Blutentziehung selbst zu finden sein.

Diese Autoren benutzten zur Durchführung des Aderlasses die Saugglocke nach *Zahn* (30). Hierbei ist zunächst die Frage zu stellen, ob die Anwendung der *Zahn*schen Saugglocke allein, ganz unabhängig vom Aderlaß, nicht die Ursache der Hyperlipämie sein könnte. Deswegen habe ich die Veränderungen des Plasmalipoidgehalts des Kaninchens verfolgt, bei dem nur die Saugung an den Ohren, aber kein Aderlaß ausgeführt wurde.

Die Versuchsanordnung war folgendermaßen. Je nach der Größe des Kaninchenkopfes wurde eine der *Zahn*schen Saugglocken mit verschiedenem Durchmesser (3,6, 3,9, 4,2 und 4,5 cm) an beiden Ohren ganz fest angelegt und mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Der einmalige Saugvorgang dauerte 2 bis 3 Minuten und wurde mit Intervallen von einigen Minuten zwei bis dreimal wiederholt, so daß im ganzen täglich 5 bis 10 Minuten gesaugt wurde. Diese Behandlung wurde jeden Abend zwischen 20 und 21 Uhr durchgeführt.

Tabelle III und IV zeigen die Resultate dieser Versuche. Dem Tier Nr. 2 wurden einmal 2,5 ccm Blut entnommen und dann an ihm keine Saugung ausgeführt. Dem Tier Nr. 3 wurden zunächst auch 2,5 ccm Blut

Tabelle III. Kaninchen Nr. 2, ♂. 8. und 22. X. 2,5 ccm Blut zur Analyse entnommen, Saugung nicht ausgeführt.

Tabelle III. Kaninchen Nr. 2, ♂. 8. und 22. X. 2,5 ccm Blut zur Analyse entnommen, Saugung nicht ausgeführt.

Datum	Körpergewicht kg	Trübung des Plasmas	Phosphatide mg-%	Freies Cholesterin mg-%	Gesamt-Cholesterin mg-%	Verestertes Cholesterin mg-%	Cholesterinester mg-%	Neutralfette mg-%	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %
8. X.	1,77	—	114	17	47	30	49	110	290	4,48	78	6,55
22. X.	1,85	—	118	19	49	30	49	109	295	4,60	90	6,76

Tabelle IV. Kaninchen Nr. 3, ♂. 8. und 22. X. 2,5 ccm Blut zur Analyse entnommen. Jeden Abend wurde 10 Minuten lang gesaugt.

Datum	Körpergewicht kg	Trübung des Plasmas	Phosphatide mg-%	Freies Cholesterin mg-%	Gesamt-Cholesterin mg-%	Verestertes Cholesterin mg-%	Cholesterinester mg-%	Neutralfette mg-%	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %
8. X.	2,03	—	128	25	72	47	76	76	305	4,85	91	6,44
22. X.	2,10	+++	244	66	153	87	141	755	1206	3,68	73	6,77

Tabelle V. Kaninchen Nr. 10, ♂. Täglich 20 ccm Blut aus der Jugularvene entnommen und sofort reinjiziert.

Datum	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Menge des entnommenen und reinjizierten Blutes ccm	Zeitdauer der Entnahme und Reinjektion Min.	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %
21. XI.	2,20	2,0			41,5	—	368	5,07	103	5,90
22. XI.	1,95		20	5		—				
23. XI.	1,96	0,40	20	15	40,2	—	200			
24. XI.	1,94	0,70	24	90	29,9	—	251	5,36	104	6,01
25. XI.	1,88	0,82	22	17	32,7	—	278			
26. XI.	1,84	0,30	21	6	33,1	—	236			
27. XI.	1,90	0,44	20	5	30,8	—	268	5,20	102	6,12
28. XI.	2,01	0,48	21	5	34,1	—	351			
29. XI.	2,00	0,40	20	15	33,5	—	318			
30. XI.	1,86	0,86	18	15	28,4	—	276	5,25	96	6,12
1. XII.	1,91	0,68	17	60	29,0	—	335			
2. XII.	1,93	2,0			30,0	—	295	5,10	96	6,12

entnommen und dann, ohne weiteres Blut zu entziehen, 2 Wochen lang jeden Abend gesaugt. Nach Ablauf der 2 Wochen wurde schließlich den beiden Kaninchen je eine Blutprobe entnommen und miteinander verglichen. Bei Tier Nr. 2 war keine Veränderung des Plasmalipoidgehalts aufgetreten, dagegen zeigte das Tier Nr. 3 tatsächlich eine vierfache Steigerung des Gesamtlipoidgehalts, wobei auch eine beträchtliche Trübung des Plasmas konstatiert wurde. Diese Hyperlipämie ist nicht zufällig, sondern ist eine bei der Applikation des Saugverfahrens konstant auftretende Erscheinung, worüber weiter unten noch ausführlich die Rede sein wird.

Um die Annahme von *Rosenthal* (23) u. a., der Vorgang der Blutentziehung selbst sei die Ursache der Aderlaßlipämie, noch in einer anderen Weise zu prüfen, habe ich weiter den folgenden Versuch angestellt, den ich in Tabelle V wiedergebe. Bei einem Kaninchen wurden nämlich, ohne die Saugglocke anzuwenden, täglich etwa 20 ccm Vollblut einer abpräparierten Jugularvene entzogen, und zwar mit einer Spritze, die vorher 2 ccm 10%ige Natriumcitratlösung enthielt. Das entnommene Blut wurde dann sofort wieder in die Jugularvene zurückinjiziert. Bei Wiederholung dieses Verfahrens während einer Dauer von 10 Tagen fand man keine Veränderung der Erythrocytenzahl, des Hämoglobin- und Serumeiweißgehalts; das Plasma blieb ganz klar und sein Lipoidgehalt wies auch keine Erhöhung auf. Die Anschauung von *Rosenthal* u. a. ist also als nicht richtig abzulehnen.

Nach alledem muß man wohl annehmen, daß die von *Rosenthal* u. a. untersuchte Hyperlipämie nur durch Applikation der Saugglocke verursacht wurde. Niemand hat bisher bemerkt, daß der negative Druck allein die Hyperlipämie hervorrufen kann. Vorläufig möchte ich diese Hyperlipämie als Sauglipämie bezeichnen und im folgenden die Entstehungsweise aufzuklären suchen.

b) Erythrocytenzahl, Hämoglobin- und Serumeiweißgehalt bei der Sauglipämie.

Wie aus den Versuchen von Tabelle VI und VII ersichtlich ist, nimmt die Erythrocytenzahl und der Hämoglobingehalt durch Saugung allmählich ab. Dieses mag darauf zurückzuführen sein, daß zu Anfang der Saugung die Ohren ödematös anschwellen und mehr oder minder subcutane Blutungen auftreten. Der Grad der Verminderung der Erythrocytenzahl ist aber viel geringer als bei der Aderlaßlipämie. Nach einiger Zeit werden die Ohren dick und hart und es erfolgen keine weiteren Blutungen mehr; die Erythrocytenzahl, der Hämatokritwert und der Hämoglobingehalt vermindern sich auch nicht mehr, sondern

Tabelle VI. Kaninchen Nr. 13, ♂. Jeden Abend Saugung ausgeführt.

Datum	Zeit	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide %	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %	Saugungsdauer Min.
17. XII.	Vor der Fütterung . . .	1,96	0,52	38,5	—	423	5,46	115	6,33	10
18. XII.										10
19. XII.	„ „ „ . . .	1,90	0,37	37,8	—	430				5
20. XII.	„ „ „ . . .	1,95	0,68	36,8	—	568				7
21. XII.	„ „ „ . . .	1,93	0,88	32,9	—	462	5,14	76	6,54	6
22. XII.	„ „ „ . . .	1,87	1,01	29,6	—	666	4,88	73	6,87	10
23. XII.	5 Std. nach der Fütterung	1,92	0,72	28,0	++	1110	3,80	76		3
24. XII.	Vor der Fütterung . . .	1,80	etwa 3	27,9	—	812	3,69	80	6,12	10
25. XII.	„ „ „ . . .	1,80	„ 3	32,6	—	892	4,33	80		
	5 Std. nach der Fütterung			36,3	+++	1570	3,56	74		6
26. XII.	Vor der Fütterung . . .	1,76		22,4	±	1090			7,74	
	2 Std. nach der Fütterung			19,4	—	952	3,51	69		
	4 „ „ „ „		„ 5	21,2	+	1160				
	6 „ „ „ „			19,8	+++	1730				
	9 „ „ „ „			19,3	++++	2350				
27. XII.	Vor der Fütterung . . .	1,74	0,53	28,2	+	1380	2,88	62		
	6 Std. nach der Fütterung		0,39	21,0	++	2120				
	9 „ „ „ „		0,45	22,2	+++	1870			7,20	1
28. XII.	Vor der Fütterung . . .		0,65	27,7	—	860	4,41	85		
	6 Std. nach der Fütterung	1,61	0,52	21,2	++	1280				
	9 „ „ „ „		etwa 2	19,6	+++	1900	3,40	72		2
29. XII.	Vor der Fütterung . . .	1,62	0,55	29,0	—	880	4,10	65	7,41	
	6 Std. nach der Fütterung		0,95	24,2	++	1350		70		

Tabelle VII. Kaninchen Nr. 14, ♂. Jeden Abend Saugung ausgeführt.

Datum	Zeit	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %	Saugungsdauer Min.
8. I.	9h	1,81	0,87	39,2	—	246	5,58	100	6,88	
	15		0,32	34,4	—	273				
	18	1,83	0,58	26,0	—	275	5,40	97		6
9. I.	9	1,77	0,48	27,1	—	268	5,33	78		
	15		0,39	25,6	—	378				
	18	1,88	0,56	21,4	—	304	4,13	71		3
10. I.	9	1,83	0,42	21,4	—	358				
	15		0,48	21,0	—	490				
	18	1,85	0,66	19,7	—	428	3,94	71	6,33	5
11. I.	9	1,90	0,46	19,5	±	582	3,53	70		
	15		0,41	21,9	±	655				
	18		0,52	17,3	±	712	3,20	65	7,21	9
12. I.	9	1,80	0,81	17,3	—	540	2,95	61		
	15		0,50	18,1	—	730				
	18	1,80	0,49	17,3	±	653	2,65	49	7,41	7
13. I.	9	1,77	0,44	18,2	—	725	2,79	47		
	15		0,60	18,3	—	673				
	18	1,80	0,50	18,1	—	735	2,63	51		4
14. I.	9	1,70	0,62		—	746	2,95	57		
	15	1,74	0,36	19,4	—	822				
	18	1,77	0,32		—	902	2,98	59		5
15. I.	9	1,67	0,45	17,7	+	1004	2,89	51		
	15	1,72	0,60	21,7	++	1350				
	18	1,74	0,40	20,0	+++	1560	2,54	40	6,33	5
16. I.	9	1,63	0,52	19,3	—	1180	2,47	51		
	15	1,68	0,52	17,3	+	1190				
	18	1,69	0,44	18,2	+	1120	2,56	45		5
17. I.	9	1,55	0,34	23,5	—	860	2,82	48		
	15	1,70	etwa 2	20,3	++	1090				
	18	1,70	„ 2	25,0	++	1090	2,68	50		5
18. I.	9	1,66	1,00	20,2	++	950	2.60	44		
	15	1,64	0,32	20,3	++	902				
	18	1,70	0,78	20,5	+++	1770	2,96	46	6,22	

zeigen sogar eine Neigung zur Vermehrung. Die Hyperlipämie tritt schon vor der merklichen Verminderung der Erythrocytenzahl usw. auf und bleibt stehen oder steigt weiter an, wenn die Erythrocytenzahl usw. eine Neigung zur Vermehrung zeigen. Auch der Serumeiweißgehalt zeigt im ganzen Verlauf dieses Versuchs keine Verminderung. Was die Trübung des Blutplasmas anbetrifft, so beginnt sie 6 Stunden nach dem Beginn der Fütterung beträchtlich zuzunehmen und erreicht 3 Stunden

später ihre höchste Intensität; am nächsten Morgen ist das Serum wieder weniger getrübt oder sogar fast ganz klar.

Um die durch Saugung herbeigeführte Verminderung der Erythrocyten zu vermeiden, wurden von zwei Spenderkaninchen täglich 20 bis 30 ccm Blut, und zwar abwechselnd oder gleichzeitig, entnommen, und die durch Zentrifugieren vom Plasma abgeschiedenen Erythrocyten in einer geringen Menge physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und dem Versuchstier intravenös injiziert. Tabelle VIII zeigt das Ergebnis. Zwar wird dabei doch eine ganz geringgradige Anämie beobachtet, aber die Zahl der Erythrocyten liegt im Bereich von 4 Millionen und der Hämoglobingehalt bleibt über 70 % stehen. Nichtsdestotrotz wird die Trübung des Plasmas sehr beträchtlich und der Gesamtlipoidgehalt steigert sich ebenso sehr wie bei der Saugung ohne

Tabelle VIII. Kaninchen Nr. 21, ♂. Jeden Abend Saugung, sonst jeden Tag zwischen 13 und 14 Uhr Erythrocytentransfusion.

Datum	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %	Saugungsdauer Min.	Erythrocytenmenge ccm
23. II.	1,97	2,0	37,2	—	355	5,45	109	6,44		
24. II.									2	
25. II.		0,42	31,0	—	441					
	1,74	0,34	32,4	—	480	5,28	90		3	etwa 6
26. II.		0,45	26,7	—	434					
	1,94	0,83	35,0	+	512	5,49	90		3	„ 6
27. II.		0,39	24,3	—	432					
	1,91	0,52	25,0	+	508	4,58	78	6,88	4	„ 5
28. II.	1,94	0,36	27,8	—	400	5,14	96		5	„ 5
		0,61	31,2	++	720					
1. III.	1,94	0,54	35,2	—	518	5,32	109		6	„ 5
		0,56	34,0	++	675					
2. III.	1,89	0,35	30,0	—	512	4,16	81		6	„ 5
		0,45	26,7	+	526					
3. III.	1,76	0,37	30,0	—	864	4,01	80	6,78	7	„ 4
	1,82	0,45	24,5	+	684					
4. III.	1,69	0,47	26,6	—	470	4,77	74		8	„ 4
	1,93	0,49	30,6	+++	1420					
5. III.	1,75	0,39	28,9	—	575	4,81	88		9	„ 4
	1,96	0,74	31,5	++	803					
6. III.	1,70	0,60	35,0	—	527					
	1,82	0,45	35,7	++	857	5,08	80	6,55		

Erythrocyteninjektion. Besonders hochgradig ist die Hyperlipämie am 9. Tage des Versuchs.

Aus diesem Versuche kann man ersehen, daß die Verminderung der Erythrocyten keine wesentliche Rolle bei der Entstehung unserer Hyperlipämie spielt.

c) Nahrungsaufnahme und Sauglipämie.

Nach den oben angeführten Versuchen versteht sich schon von selbst, daß die Sauglipämie in inniger Beziehung zur Nahrungsaufnahme steht. Durch die folgenden Versuche wird dieses Verhältnis noch eindeutiger. Zwei Kaninchen, Nr. 15 und Nr. 16 (Tabelle IX und X) erhielten während des ganzen Versuchs außer einer kleinen Menge Wasser kein Futter. An dem Tier Nr. 16 führte man eine Saugung aus, die an dem Kontrolltier Nr. 15 nicht vorgenommen wurde. Bei dem letzteren zeigte sich zwar eine Tendenz zu geringer Erhöhung der Gesamtlipoide des Plasmas, aber diese war nicht so deutlich wie bei dem von *Wendt* (31) angestellten Hungerversuch an Hunden. Das Körpergewicht nahm zusehends ab, der Hämatokritwert, der Hämoglobingehalt, die Erythrocytenzahl und das Serumeiweiß zeigten jedoch keine Veränderungen. Bei dem Tier, an welchem während des Hungerzustandes die Saugung vorgenommen wurde, verminderten sich die Erythrocytenzahl, der Hämatokritwert, der Hämoglobingehalt und das Körpergewicht etwa bis zu dem gleichen Grade wie bei den Saugversuchen am gefütterten Tier; trotzdem trübte sich das Plasma nur ganz wenig und die Gesamtlipoide zeigten nur eine ganz geringe Zunahme wie bei dem Tier Nr. 15. Auch das Serumeiweiß blieb unverändert. Durch Saugung während des Hungerzustandes entsteht also keine Hyperlipämie.

Tabelle IX. Kaninchen Nr. 15, ♂.

Seit 31. I. während des ganzen Verlaufes des Versuchs hungern gelassen. Keine Saugung ausgeführt.

Datum	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %
1. II.	2,15	2,0	43,3	—	275	5,83	112	6,33
2. II.	2,10	0,42	33,4	—	230			
3. II.	1,98	0,36	34,7	—	243	6,21	117	6,52
4. II.	1,96	0,50	33,8	—	332			
5. II.	1,95	0,53	35,9	—	320	5,38	111	6,76
6. II.	1,84	0,74	36,5	—	324			
7. II.	1,83	0,49	34,8	—	353	5,42	113	6,98
8. II.	1,72	0,45	37,8	—	339			
9. II.	1,70	0,58	34,5	—	350	5,40	110	6,52

Tabelle X. Kaninchen Nr. 16, ♂.
Saugversuch im Hungerzustand. Seit 31. I. hungern gelassen.

Datum	Zeit	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %	Saugungsdauer Min.
1. II.	9h	2,11	2,0	46,0	—	366	6,25	121	6,98	4
2. II.	9	2,10	0,58	34,5	—	358				
	18		0,45	31,2	—	368	5,68	105		5
3. III.	9	2,03	0,34	29,4	—	382				
	18		0,57	29,8	—	410	5,10	95	6,98	5
4. III.	9	1,94	0,90	28,0	—	455				
	18		0,68	26,5	—	456	4,39	88		6
5. III.	9	1,91	0,42	26,2	—	474				
	18		0,48	27,0	—	538	3,82	80	6,76	7
6. III.	9	1,84	0,74	25,8	—	505				
	18		0,38	21,0	—	460	3,60	75		8
7. III.	9	1,81	0,45	19,8	—	475				
	18		0,68	22,0	—	462	3,27	68	6,54	7
8. III.	9	1,68	0,54	24,1	±	480				
	18		0,59	22,0	±	422	3,50	72		6
9. III.	9	1,65	0,48	20,8	—	415				
	18		0,45	21,0	—	430	3,10	62	6,85	

Tabelle XI. Kaninchen Nr. 18, ♂.
Saugung im Hungerzustand während 7 Tage, dann Nahrung gegeben.

Datum	Zeit	Körpergewicht kg	Versuchsordnung	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %	Saugungsdauer Min.
10. II.	9h	1,78	Seit 9. II. fasten gelassen	2,0	40,5	—	252	6,25	120	6,98	4
11. II.	9	1,72		0,71	36,1	—	267	5,40	106		10
12. II.	9	1,64		0,70	28,5	—	339	3,88	91		7
13. II.	9	1,64		0,45	26,6	—	337	2,94	68	6,23	5
14. II.	9	1,54		0,52	25,0	—	313	2,75	63		8
15. II.	9	1,46		0,88	23,5	—	285	2,69	60		8
16. II.	9	1,33		0,59	20,0	—	226	2,66	59	6,23	6
17. II.	9	1,27		0,55	18,7	—	159				
	18	1,35		0,71	21,1	—	227	2,69	58		5
18. II.	9			0,54	20,0	—	278				
	18	1,44		0,59	22,0	++	1130	1,99	41		3
19. II.	9			0,42	21,4	—	462				
	18	1,41		0,87	17,2	++	1013	2,05	40	6,12	
21. II.	9			0,32	17,3	—	603				4
	18	1,40		0,78	16,8	+	850	2,10	41	6,98	7
22. II.	9		Vom 17. II. Nahrung gegeben	0,59	18,7	—	747				7
	18	1,38		2,0	17,9	+++	1440	1,92	38		

Im Versuch der Tabelle XI wurde an dem Kaninchen Nr. 18 während einer Woche im Hungerzustand eine kräftige Saugung vorgenommen und nach Ablauf dieses Zeitraums das Hungern unterbrochen. Trotzdem das Körpergewicht durch die Saugung während des Hungerns zuerst ziemlich abnahm und das Tier deutlich anämisch wurde, erhöhte sich der Gehalt der Gesamtlipoide nicht, sondern erniedrigte sich sogar ein wenig. Als man aber dem Tiere unter weiterer Saugung Nahrung gab, entstand ganz plötzlich eine hochgradige Hyperlipämie. Die Trübung des Plasmas war dabei am Abend sehr deutlich, während sie am nächsten Morgen gewöhnlich wieder verschwand. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß ohne Nahrungsaufnahme keine Sauglipämie entsteht. Das Maximum der Hyperlipämie wird in 7 bis 9 Stunden nach dem Beginn der Nahrungsaufnahme erreicht.

d) Einzelne Lipoidfraktionen bei Sauglipämie.

Ferner führte ich eine Analyse der einzelnen Lipoidfraktionen bei der Sauglipämie aus und erforschte die Art und Weise der Beteiligung jeder Fraktion an dieser Hyperlipämie. In Tabelle XII werden die Ergebnisse der Analysen von fünf Fällen wiedergegeben. Bei der Saugung nehmen zuerst die Neutralfette rasch zu, und man beobachtet dabei eine auffallende Trübung des Plasmas. Am nächsten Morgen erniedrigt sich der Gehalt an Neutralfetten, wobei die Trübung des Plasmas viel schwächer wird. Die Phosphatide und das Cholesterin nehmen langsam zu und zeigen keine so großen Schwankungen wie die Neutralfette. Dieser Befund mag die Annahme unterstützen, daß die Trübung des Plasmas, die bei der Saugung entsteht, hauptsächlich von den mit der Nahrung aufgenommenen Neutralfetten stammt und daß diese Neutralfette sich allmählich in Phosphatide und Cholesterin umwandeln. *Bloor* (32) hat die Hyperlipämie in eine alimentäre und eine persistente eingeteilt und gesagt, daß bei der ersteren die weißliche Trübung des Plasmas deutlich sichtbar ist, während bei der letzteren dagegen keine Plasmatrübung auftritt, wenn auch der Lipoidgehalt groß ist. Er hat diesen Zustand auch „maskierte Lipämie" genannt. Die Sauglipämie zeigt demnach anfangs die Eigenschaft der auffallenden alimentären Hyperlipämie, die dann allmählich in den Zustand der persistenten übergeht. Jedenfalls darf man die Intensität der Hyperlipämie nicht bloß nach der Trübung des Plasmas bzw. des Serums beurteilen, sondern man muß auch stets den Gesamtlipoidgehalt in Betracht ziehen.

Aderlaßlipämie und Nahrungsaufnahme.

Über die Aderlaßlipämie sind, wie schon erwähnt, viele Arbeiten veröffentlicht worden. Bisher sind aber keine ausgiebigen Versuche im Hungerzustand angestellt worden. Nur *Saito* (4) teilte mit, daß bei

Tabelle XII. Beispiele für die Plasmalipoidanalyse bei Sauglipämie.

Fälle	Datum	Trübung des Plasmas	Phosphatide mg-%	Freies Cholesterin mg-%	Gesamt-Cholesterin mg-%	Verestertes Cholesterin mg-%	Cholesterinester mg-%	Neutralfette mg-%	Gesamtlipoide mg-%
Nr. 8, ♂, 1,88 kg. Seit 6. bis 10. XI. stark gesaugt. Am 11. XI. Saugung ausgesetzt	5. XI.	—	128	40	50	10	16	198	382
	10. XI.	—	220	96	137	41	67	384	767
	11. XI.	++++	350	210	280	70	113	2227	2900
	20. XI.	—	80	67	93	26	42	133	322
Nr. 9, ♂, 1,96 kg. Seit 6. bis 10. XI. Saugung ausgeführt. Am 11. XI. Saugung ausgesetzt	5. XI.	—	107	32	66	34	55	89	283
	11. XI.	++++	355	250	296	46	75	2270	2950
	12. XI.	++	291	112	195	83	135	653	1191
	20. XI.	—	77	60	75	15	24	58	219
Nr. 11, ♂, 2,04 kg. Seit 2. bis 10. XII. Saugung ausgeführt	29. XI.	—	125	17	54	37	60	175	377
	8. XII.	++	249	27	101	74	120	448	844
	11. XII.	—	263	85	113	28	45	280	673
Nr. 14, ♂, 1,81 kg. Seit 8. bis 17. I. Saugung ausgeführt	6. I.	—	159	41	107	66	107	43	350
	17. I.	++	262	133	208	75	121	498	1014
	18. I.	+++	426	186	262	76	123	1060	1795
Nr. 13, ♂, 1,96 kg. Seit 18. bis 28. XII. Saugung ausgeführt									
Vor der Fütterung	17. XII.	—	77	47	99	52	84	27	235
" " "	22. XII.	—	161	101	161	60	97	298	657
5 Stunden nach der Fütterung	23. XII.	++	257	149	218	69	112	615	1133
Vor der Fütterung	24. XII.	—	267	149	204	55	89	360	865
" " "	25. XII.	—	245	90	217	127	206	344	885
5 Stunden nach der Fütterung	25. XII.	+++	258	68	180	112	182	985	1493
Vor der Fütterung	26. XII.	+	278	118	183	65	105	630	1131
" " "	28. XII.	—	242	109	220	111	180	270	801
9 Stunden nach der Fütterung	28. XII.	+++	391	125	205	80	130	1216	1862
Vor der Fütterung	29. XII.	—	212	118	191	73	118	330	778

dreitägigem Hungern keine Hyperlipämie auftrat. Da nun festgestellt worden ist, daß bei der Entstehung der Sauglipämie die Nahrungsaufnahme eine notwendige Bedingung ist, untersuchte ich diesbezügliche Verhältnisse auch bei der Aderlaßlipämie. Das Ergebnis zeige ich in den Tabellen XIII und XIV. An dem Kaninchen Nr. 19, das als Kontrolltier Nahrung erhielt, wurden einen Tag um den anderen je etwa 20 ccm Blut aus den Jugular- oder Ohrvenen entnommen. An dem Kaninchen Nr. 20 wurde die Blutentziehung auf ganz gleiche Weise ausgeführt, aber dieses Tier erhielt während 9 Tage kein Futter. Bei dem Kaninchen Nr. 19 entstand nun durch Aderlaß von 115 ccm Blut eine hochgradige Hyperlipämie von etwa 4000 mg-%, dagegen entstand bei Nr. 20 während der Dauer von 9 Tagen tatsächlich keine Hyperlipämie. Bei diesem Tier wurde darauf der Aderlaß unterbrochen und das Tier gefüttert. Die Erythrocytenzahl zeigte 5 Tage nach der Unterbrechung des Aderlasses eine zunehmende Tendenz, und trotzdem trat eine ebenso hochgradige Hyperlipämie wie bei Nr. 19 auf. Bei Nr. 19 nahm das Serumeiweiß von

Tabelle XIII. Kaninchen Nr. 19, ♂. Aderlaß bei Nahrungsaufnahme.

Datum	Körpergewicht kg	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %	Serumeiweiß %
23. II.	2,60	5	38,2	—	283	5,82	113	7,02
25. II.	2,38	20		—	270			
27. II.	2,33	20		—	281			6,54
1. III.	2,35	20		—	313			
3. III.	2,34	15		+	770			5,90
4. III.		15	22,5	+	770			
	2,35		19,0	++	840	2,76	40	5,20
5. III.		20	21,8	—	852			
	2,22		16,7	+++	1340	2,20	32	4,95
6. III.		0,80	18,8	++++	3760			
	2,24	0,69	18,8	++++	3910	1,80	25	
7. III.		0,73	19,2	++	2950			
	2,20	0,50	22,0	++	2380			
8. III.		0,52	18,0	+	2070			
	2,20	0,59	20,5	+	1960	2,24	34	5,68
10. III.		0,72	20,8	+++	2150			
	2,00	0,47	18,0	++	2160	2,52	38	
14. III.		0,86	24,5	++	1720			
	2,22	0,67	23,3	++	2110	3,22	43	6,22
15. III.		0,79	25,3	+++	2590			
	2,23	0,80	21,3	++	2200	3,65	42	
19. III.		0,80	23,8	+	1970			
	2,20	0,54	18,5	++	2500			
30. III.	2,12	1,16	26,7	++	2650			
31. III.	2,10	1,45	26,9	++	2820	3,75	54	7,12

Tabelle XIV. Kaninchen Nr. 20, ♂. Zuerst Aderlaß im Hungerzustand, dann Nahrungsaufnahme ohne Aderlaß.

Datum	Körpergewicht kg	Versuchsordnung	Entnommene Blutmenge ccm	Hämatokritwert %	Trübung des Plasmas	Gesamtlipoide mg-%	Erythrocyten Mill.	Hämoglobingehalt %
23. II.	2,59	Seit 22. II. hungern gelassen	5	40,0	—	357	6,11	117
26. II.	2,31		20		—	310		
28. II.	2,15		20		—	376		
2. III.	2,12		20		—	357		
3. III.	2,10		15		—	362		
4. III.	1,96		15		—	400		
5. III.	1,94		15		±	480	2,64	43
6. III.	1,86		15	27,5	±	465	2,48	40
7. III.	1,89	Seit 7. III. Nahrung gegeben	0,45		—	664		
			0,46	18,9	±	884		
8. III.	1,88		0,40	20,0	++	1360		
			0,40	20,0	—	1080	2,80	40
10. III.	1,77		0,54	20,4	++	1320		
			0,48	19,7	+	1370		
14. III.	1,84		0,60	19,3	++	1290		
			0,45	21,4	+++	2220		
15. III.	1,84		0,45	18,9	+++	3580		
			0,70	21,7	++++	3900	2,94	41
19. III.	1,67		0,59	23,7	±	1290		
			0,83	25,2	±	1380		
30. III.			1,00	24,0	±	1450		
31. III.	1,62		1,14	26,3	—	1080	3,93	49
19. IV.	1,46		0,82	33,0	—	975	4,80	75

7,02 % bis zu 4,95 % ab, aber nach Unterbrechung des Aderlasses kehrte es dann allmählich bis zum Anfangswert zurück. Aus den Versuchen geht hervor, daß ohne Nahrungsaufnahme auch die Aderlaßlipämie nicht entstehen kann.

Tabelle XV zeigt die Resultate der Blutanalyse der Kaninchen Nr. 19 und 20. Man sieht, daß die weißliche Trübung des Plasmas auch hier eine Zunahme der Neutralfette anzeigt, genau so wie bei der in Tabelle XII gezeigten Sauglipämie.

Erwägungen über die Genese der Aderlaßlipämie.

Es ist ganz selbstverständlich, daß das Serumeiweiß durch den Aderlaß abnimmt; die Frage ist, in wie weit die Verminderung des Serumeiweißes für die Entstehung der Hyperlipämie verantwortlich ist. Wie aus meinen Saugversuchen hervorgeht, tritt die hochgradige Hyperlipämie durch alleinige Saugung ohne Aderlaß auf, wobei das Serumeiweiß ganz unverändert bleibt. Darum ist die Annahme von *Fischberg* (17) und seinen Anhängern, daß die Verminderung des Serum-

Tabelle XV. Plasmalipoidanalyse.

Fälle	Datum	Trübung des Plasmas	Phosphatide mg-%	Freies Cholesterin mg-%	Gesamtcholesterin mg-%	Verestertes Cholesterin mg-%	Cholesterinester mg-%	Neutralfette mg-%	Gesamtlipoide mg-%
Nr. 19, ♂. Aderlaßlipämie. Seit 25. II. bis 5. III. Aderlaß ausgeführt	23. II.	—	75	40	114	74	120	28	263
	5. III.	++++	178	109	139	30	49	716	1052
	6. III.	++++	558	316	336	20	32	2814	3720
	30. III.	+++	486	180	288	108	176	1424	2266
	31. III.	++	450	207	340	133	215	1840	2712
Nr. 20, ♂. Aderlaß während des Hungerns, dann Nahrung gegeben	23. II.	—	142	47	121	74	120	91	400
	13. III.	++++	267	186	264	78	126	1136	1715
	15. III.	++++	378	228	296	68	110	3146	3862
	30. III.	±	182	190	228	38	62	472	906
	31. III.	—	193	155	240	85	138	312	798
	10. IV.	—	255	275	337	62	100	563	1193
Nr. 21, ♂. Saugversuch mit Erythrocytentransfusion	23. II.	—	121	74	106	32	52	112	359
	4. III.	++	201	94	148	54	88	965	1348

eiweißes die Hauptursache der Aderlaßlipämie sei, nicht zutreffend.

Ferner ist es eine wichtige Frage, ob die Verminderung der Erythrocyten die direkte Ursache der Aderlaßlipämie darstellt oder nicht. In meinen Versuchen an den Tieren Nr. 19 und 20 entstand eine hochgradige Hyperlipämie durch Aderlaß von im ganzen etwa 120 ccm Blut. Die Stärke dieser Hyperlipämie stand nicht in direktem Verhältnis zu der Abnahme der Erythrocytenzahl; die Hyperlipämie wurde sogar im Stadium der Zunahme der Erythrocytenzahl noch stärker. Außerdem zeigen die Versuche über Sauglipämie in Tabelle VIII, daß die Hyperlipämie bei sehr geringfügiger Verminderung der Erythrocyten entstehen kann, und daß für die Entstehung der Hyperlipämie keine hochgradige Anämie notwendig ist, sondern schon ganz geringgradige anämische Zustände genügen. Aus diesem Grunde ist die Annahme, daß die Ver-

minderung der Erythrocyten die einzige Ursache der Aderlaßlipämie sei, ebenfalls abzulehnen.

Bei der Entstehung sowohl der Sauglipämie als auch der Aderlaßlipämie spielt dagegen die Nahrungsaufnahme eine sehr große Rolle. Es tritt nämlich ohne Nahrungsaufnahme weder die Saug- noch die Aderlaßlipämie zutage. Nach Erwägung all dieser Umstände könnte man annehmen, daß die Saug- und Aderlaßlipämie eigentlich wesensgleich sind, und daß beide wohl keine wesentlichen Beziehungen zu dem Serumeiweiß und den Erythrocyten haben. Ich möchte eher behaupten, daß diese Hyperlipämien, normale Nahrungsaufnahme vorausgesetzt, durch die Saugkraft oder die Zugwirkung seitens des Gewebes auf das Blut, bzw. seitens des Blutes auf die Darmlymphe, verursacht werden. Die Zugwirkung wird nicht immer durch die Herabsetzung des kolloid-osmotischen Drucks veranlaßt, sondern auch die mechanische Saugung kann den gleichen Effekt hervorrufen. So könnte man auch verstehen, daß bei perniziöser Anämie oder bei Ödemen von Herzkranken keine Hyperlipämie, dagegen bei Ödemen von Nephrose eine hochgradige Hyperlipämie vorkommt.

Zusammenfassung.

1. Es ist gezeigt worden, daß man bei Kaninchen nur durch Anwendung der Saugwirkung an den Ohren, und zwar ohne Aderlaß, Hyperlipämie erzeugen kann. Diese Hyperlipämie möchte ich als Sauglipämie bezeichnen.

2. Die Sauglipämie zeigt anfangs den Zustand der alimentären Hyperlipämie, die allmählich hochgradiger wird und schließlich in den Zustand der persistenten Hyperlipämie übergeht. Bei der Sauglipämie vermindert sich das Serumeiweiß nicht, und sie kann auch ohne Verminderung der Erythrocyten auftreten.

3. Im Hungerzustand entsteht weder die Saug- noch die Aderlaßlipämie. Wenn man während eines bestimmten Zeitraumes Saugung oder Aderlaß im Hungerzustand ausführt und dann dem Tier Nahrung gibt, so entsteht ganz plötzlich Hyperlipämie. Die Nahrungsaufnahme ist also eine notwendige Bedingung für die Entstehung der Saug- und Aderlaßlipämie.

4. Die Saug- und Aderlaßlipämie entsteht, normale Nahrungsaufnahme vorausgesetzt, durch die Saugkraft oder die Zugwirkung von Seiten des Gewebes auf das Blut, bzw. von Seiten des Blutes auf die Lymphe des Darmtraktus. Diese ziehende Kraft kann entweder eine mechanische oder eine kolloid-osmotische sein.

5. Die weißliche Trübung des Plasmas stammt von der raschen Zunahme der Neutralfette. Wenn aus den Neutralfetten Phosphatide und Cholesterin gebildet werden, so verschwindet die Trübung des Plasmas, wenn auch der Gehalt der Gesamtlipoide hoch ist.

Literatur.

1) *Boggs* u. *Morris*, J. of exper. Med. **11**, 553, 1909. — 2) *Morawitz* u. *Pratt*, Münch. med. Wochenschr. **55**, 1817, 1908. — 3) *Milne*, Arch. f. klin. Med. **109**, 401, 1913. — 4) *Saito*, Fukuoka Ikadaigaku Zasshi **13**, 367, 1920. — 5) *Schmitz* u. *Koch*, diese Zeitschr. **223**, 257, 1930. — 6) *Mill*, Arch. f. d. ges. Physiol. **224**, 304, 1930. — 7) *Sakai*, diese Zeitschr. **62**, 387, 1914. — 8) *Horiuchi*, J. of biol. Chem. **44**, 363, 1920. — 9) *Feigl*, diese Zeitschr. **115**, 63, 1921. —10) *Tsuda*, Okayama Igakkai Zasshi **41**, 450, 1929. —11) *Edelmann*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, 221, 1922. — 12) *Dörle*, diese Zeitschr. **34**, 406, 1923. — 13) *Eichholz*, diese Zeitschr. **151**, 187, 1924. — 14) *Nagashima*, Aichi Igakkai Zasshi **41**, 1755, 1934. — 15) *Rix* u. *Müller*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **78**, 15, 1931. — 16) *Jastrowitz*, ebenda **27**, 276, 1922. — 17) *Arthur* u. *Ella Fischberg*, diese Zeitschr. **195**, 20, 1928. — 18) *Mauriac*, *Servantie* u. *Demenier*, C. r. Soc. Biol. **115**, 558, 1934. — 19) *Hecht Johansen*, J. of biol. Chem. **88**, 669, 1930. — 20) *Lichtenstein* u. *Epstein*, Arch. Int. Med. **47**, 122, 1931. — 21) *Starup*, diese Zeitschr. **270**, 74, 1934. — 22) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **224**, 116, 1934. — 23) *Rosenthal*, *Friedländer* u. *Kohn*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **175**, 343, 1934. — 24) *Raab*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **49**, 179, 1926. — 25) *Bodansky*, J. of biol. Chem. **63**, 239, 1925. — 26) *Chamberlain* u. *Corlett*, Brit. J. of exper. Path. **13**, 299, 1932. — 27) *Heki*, J. of Biochem. **11**, 369, 1930. — 28) *Milbradt*, diese Zeitschr. **223**, 278, 1930. — 29) *Katsura*, *Hatakeyma* u. *Tajima*, ebenda **269**, 221, 1934. — 30) *Zahn*, Münch. med. Wochenschr. **59**, 861, 1912. — 31) *Wendt*, Klin. Wochenschr. Jg. 7, 2183, 1928. — 32) *Bloor*, J. of biol. Chem. **49**, 201, 1921.

Follikelhormon und Blühtermin von Chrysanthemen.

Von

Inge Störmer.

(Aus den Botanischen Anstalten der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 25. Januar 1936.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In der IV. Mitteilung von *Schoeller* und *Goebel*[1] wird über neue günstige Erfolge durch Hormonbehandlung bei Primeln, Fuchsien, Nelken, Chrysanthemen und Tomaten berichtet. Vor allem scheinen Chrysanthemen eine klare Förderung in der Entwicklung der Knospen und Blüten durch das tierische Sexualhormon zu zeigen, und *Schoeller* und *Goebel* selbst empfehlen diesen Versuch ganz besonders zur Nachprüfung.

Wir haben darum im vergangenen Sommer anschließend an unsere früheren Versuche mit anderen Objekten auch noch mit Chrysanthemen einen Hormonversuch in Topfkultur durchgeführt. Doch trotz möglichst genauen Einhaltens der von *Schoeller* und *Goebel* angegebenen Versuchsbedingungen und sorgfältigster Durchführung des Versuchs konnte keinerlei Einwirkung des Hormons auf die Pflanzen erzielt werden. Über die Ergebnisse möchte ich im folgenden kurz berichten.

I. Methodik.

Der Versuch wurde mit 105 Exemplaren der Sorte *Majestic* (mittelfrüh, großblumig, Blüte broncefarben) angesetzt.

Die Chrysanthemen waren von mir selbst am 27. Juni beim Gärtner aus einem Satz von etwa 300 schon ziemlich gleichmäßig gewachsenen Stecklingen aussortiert worden. Die etwa 35 cm hohen Pflanzen waren fertig getopft (Topfgröße 15 cm Durchmesser), befanden sich in einem Gemisch von Laubmit Komposterde und hatten Volldüngung erhalten.

Fünf Gruppen zu je 15 Exemplaren wurden mit Hormon in folgenden Dosierungen[2] behandelt:

1. 1000 ME. technisches Progynon der *Schering-Kahlbaum-A.-G.*, Berlin (Standardlösung 100 ME. pro ccm).

2. 1000 ME. kristallisiertes α-Follikelhormon (Schmp. 254 bis 255°C; Wirkungswert 5 Millionen ME. pro Gramm) von Prof. *Butenandt*, Danzig.

---

[1] Diese Zeitschr. **278**, 298, 1935. Literatur siehe bei *Harder* und *Störmer*, Jahrb. wiss. Botan. **81**, 383, 1935; und diese Zeitschr. **280**, 126, 1935. — [2] Nach *Schoeller* und *Goebel* liegt die optimale Dosierung für Chrysanthemen bei 1000 ME. pro Woche. *Schoellers* und *Goebels* Pflanzen erhielten ein Rohkristallisat in wässeriger, schwach alkalischer Lösung.

3.—5. 500, 1000 und 1500 ME. Natriumsalz des reinen α-Kristallisats.

Zwei Gruppen zu je 15 Pflanzen dienten als Kontrollen:

1. Aqua dest.

2. Aqua dest. mit der gleichen Menge Alkali, die in der 1000 ME.-Natriumsalzlösung enthalten ist; das sind 0,592 mg NaOH im Liter. Neutralisiert wurde mit verdünnter Salzsäure.

Sämtliche Pflanzen erhielten einmal wöchentlich 50 ccm der betreffenden Lösungen; außerdem wurde für die ganze Versuchsdauer wöchentlich mit 50 ccm 0,2 %iger Nitrophoskalösung pro Topf gedüngt. Im übrigen wurde mit Leitungswasser feucht gehalten.

Zunächst kamen die Kulturen in einem sonnigen Frühbeet zur Aufstellung und wurden bei Regen durch Abdecken mit Glas geschützt. Später wurden alle Pflanzen auf ein freies Versuchsfeld gebracht, wo sie bei gutem Wetter im Freien standen, des Nachts und bei regnerischem Wetter in ein fliegendes Gewächshaus geschoben wurden. Die Chrysanthemen wurden auf erste Blüte gezogen, und alle Nebensprosse, die besonders dann hervortreiben, wenn die Knospe sichtbar wird, wurden sorgfältig entfernt.

II. Die Versuche.

29. Juni 1935. Beginn der Hormonbehandlung. Dauer derselben bis zum 20. Oktober, also insgesamt 16 Wochen.

31. Juli. Erste Blütenknospen werden sichtbar.

4. Oktober. Erste Blüte entfaltet.

29. Oktober. Letzte Pflanze erblüht.

Alle 105 Pflanzen kamen zum Blühen.

1. Blühtermin.

Die Chrysanthemen entwickelten sich durchaus normal. Nach etwa 37 Tagen wurden die Blütenknospen sichtbar. Dieses Stadium wurde für jede Pflanze protokolliert. Das Ergebnis ist in Tabelle I zusammengefaßt, die in Tagen den Mittelwert für jede Gruppe angibt.

Tabelle 1.

Substrat	Tage bis zum Erscheinen der Knospen (Mittelwert)
Technisches Progynon 1000 ME./W.	37 ± 2,1
α-Kristallisat 1000 ME./W.	39 ± 2,2
Kontrolle Aqua dest.	37 ± 1,9
Na-Salz des α-Kristallisats 500 ME./W. . . .	39 ± 2,2
" " " 1000 " . . .	38 ± 2,0
" " " 1500 " . . .	38 ± 2,0
Kontrolle NaOH + HCl	37 ± 1,7

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, konnte *ein Einfluß des Hormons nicht festgestellt werden*; das etwas spätere Sichtbarwerden der Knospen

bei fast allen Hormonserien um 1 bis 2 Tage im Mittel fällt in die Grenzen des mittleren Fehlers.

Um weiterhin über die Geschwindigkeit der Knospenentwicklung orientiert zu sein, wurde mehrmals der Durchmesser aller Knospen bestimmt. Die Mittelwerte jeder Gruppe sind in Tabelle II für einige Protokolltage wiedergegeben.

Tabelle II.

Substrat	Knospendurchmesser in cm (Mittelwert)		
	10. IX.	24. IX.	3. X.
Technisches Progynon 1000 ME./W.	1,12	1,88	2,45
α-Kristallisat 1000 ME./W.	1,19	2,04	2,53
Kontrolle Aqua dest.	1,22	1,96	2,53
Na-Salz des α-Kristallisats 500 ME./W. . . .	0,98	1,68	2,17
„ „ „ 1000 „ . . .	1,16	1,90	2,44
„ „ „ 1500 „ . . .	1,26	2,03	2,63
Kontrolle NaOH + HCl	1,26	2,08	2,56

Das Ergebnis der Knospenmessungen entsprach durchaus dem augenscheinlichen Befund, *nirgends konnte eine schnellere Entwicklung bei den hormonbehandelten Pflanzen beobachtet werden.* Auch später beim Aufblühen nach etwa 98 Tagen war ein Vorsprung der Hormonpflanzen nicht vorhanden, wie Abb. 1 und die photographischen Aufnahmen

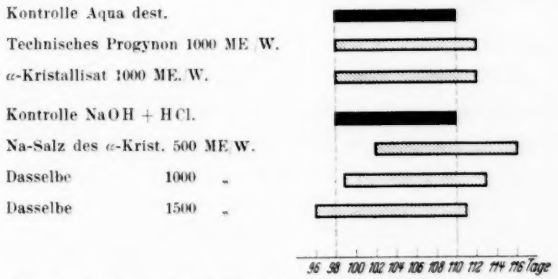


Abb. 1. Entfaltung der Blüten von Stadium 1 bis Stadium 5. Angabe in Tagen von der ersten Hormongabe an gerechnet. (Mittelwerte.)

vom 21. und 29. Oktober zeigen (Abb. 2 und 3). Die Blütenentfaltung, die sich über einen Zeitraum von etwa 20 Tagen erstreckte, wurde in fünf definierten Stadien für jede Blüte protokolliert. Abb. 1 gibt die Mittelwerte für die Entfaltung der Blüten vom ersten Erscheinen der ersten Blütenblätter (Stadium 1) bis zur Entfaltung von etwa ein Drittel aller Einzelblüten jedes Blütenkörbchens (Stadium 5) in Tagen schematisch wieder.

Aus der graphischen Darstellung ist die gute Übereinstimmung der beiden Kontrollserien ohne weiteres zu ersehen. Bei den beiden alkalifreien Hormonserien, 1000 ME. technisches Progynon und 1000 ME. reines α-Kristallisat wurden wie bei den Kontrollen nach 98 Tagen erste Blütenblätter sichtbar, nur kamen die Pflanzen im Mittel um 2 Tage später zur vollen Entfaltung ihrer Blüten; diese Abweichungen

Abb. 2. Chrysantheme „Majestie". Wöchentliche Hormongabe 1500 ME. Natriumsalz des reinen α-Kristallisats. Phot. 21. Oktober 1935. Aus jeder Serie die drei besten und die drei schlechtesten Pflanzen. Oben Alkalikontrolle, unten Versuch.

liegen jedoch noch innerhalb der Fehlergrenzen. Auch das in alkalischer Lösung gegebene reine Kristallisat verhielt sich in seinen höheren Dosierungen von 1000 und 1500 ME. sehr ähnlich wie die Kontrollen. Die Abweichungen, die teils eine geringe Förderung (1500 ME. Stadium 1), teils eine leichte Verzögerung (1500 ME. Stadium 5; 1000 ME.) erkennen lassen, betragen 1 bis 3 Tage und überschreiten die Grenzen des mittleren Fehlers nicht.

Eine Ausnahmestellung nahm die Serie 500 ME.-Na-Salz ein, die eine Hemmung durch das Hormon um 4 bis 6 Tage im Mittel zeigte. Diese Verzögerung in der Blütenentwicklung ging schon aus den Knospenmessungen hervor. An allen Protokolltagen lagen, wie auch aus Tabelle II zu entnehmen ist, die Mittelwerte für den Durchmesser der Knospen um etwa 15% unter den Werten der Kontrollserien und den übrigen Hormonserien. Den Grund für die langsamere Entwicklung gerade dieser 500 ME.-Pflanzen kennen wir leider nicht.

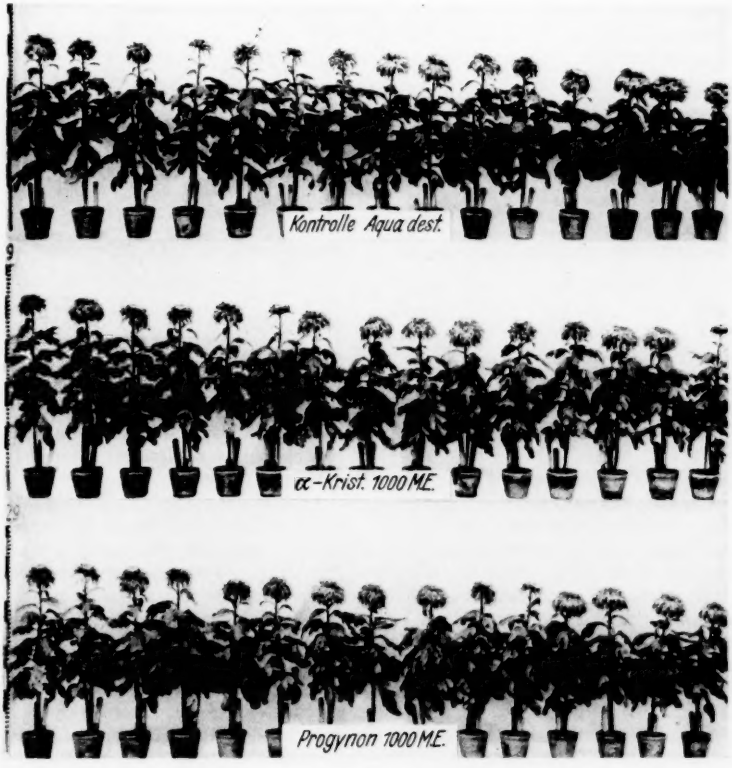


Abb. 3. Chrysantheme „Majestie". Wöchentliche Hormongabe 1000 ME. α-Kristallisat und 1000 ME. techn. Progynon. Phot. 29. Oktober 1935. Sämtliche Versuchspflanzen. Oben Kontrolle Aqua dest., Mitte α-Kristallisat, unten techn. Progynon.

Irgendeine Förderung des Hormons weder in neutraler noch in alkalischer Lösung auf die Blütenbildung und Blütenentwicklung konnte bei den Chrysanthemen jedenfalls nicht erzielt werden.

2. *Vegetatives Wachstum.*

Dem bloßen Aussehen nach unterschieden sich die einzelnen Versuchsserien nicht voneinander. Alle Pflanzen machten einen gesunden

Eindruck; sie waren kräftig entwickelt, hatten dunkelgrüne, große Blätter und bildeten ohne Unterschied zahlreiche Seitentriebe aus, die, wie schon erwähnt, regelmäßig entfernt wurden.

Häufige *Längenmessungen* zeigten, daß während der Entwicklung die Größen der Pflanzen stets übereinstimmten, wie aus Tabelle III zu ersehen ist, wo in der ersten Kolonne die Mittelwerte für die Gesamthöhe, die von den Pflanzen erreicht wurde, angegeben sind.

Tabelle III.

Substrat	Gesamthöhe in cm (25. X. 1935)	Blattzahl pro Pflanze	Blattoberfläche qcm	Gesamtfläche der Blätter pro Pflanze qcm
Technisches Progynon 1000 ME./W. .	67,0	39 ± 1	93,5	3650
α-Kristallisat 1000 ME./W.	69,4	39 ± 1	99,5	3870
Kontrolle Aqua dest.	69,0	39 ± 1	96,5	3760
Na-Salz des α-Kristallisats 500 ME/W.	68,3	38 ± 1	91,5	3480
„ „ „ 1000 „	69,0	37 ± 1	101,5	3750
„ „ „ 1500 „	67,0	37 ± 1	99,5	3670
Kontrolle NaOH + HCl	68,3	39 ± 1	94,0	3670

In der zweiten Kolonne der Tabelle III ist die Zahl der insgesamt von den Pflanzen ausgebildeten *Blätter* im Mittel wiedergegeben: das technische Progynon und das reine Kristallisat wiesen in Übereinstimmung mit den beiden Kontrollen pro Pflanze 39 Blätter auf, während die Serien des Natriumsalzes nur 37 bis 38 Blätter besaßen. Die Differenz um 1 bis 2 Blätter liegt außerhalb des mittleren Fehlers. Daß trotz der geringeren Blattzahl die Gesamtblattoberfläche für jede Pflanze annähernd die gleiche war, zeigten exakte *Blattflächenmessungen*. Mit Hilfe eines photoelektrischen Apparates, der nach den Angaben von *Frear*[1] gebaut worden war, wurde von je 8 Pflanzen jeder Serie am Versuchsende die Oberfläche ihrer Blätter ermittelt. Die Pflanzen hatten noch etwa 22 Blätter, insgesamt wurden 1500 Blätter ausgemessen. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle III zusammengestellt. Aus der dritten Kolonne ist die mittlere Blattgröße zu ersehen. In den Serien des α-Kristallisates und des technischen Progynons fallen die Abweichungen von ± 3 % noch in die Fehlergrenzen, anders dagegen bei den Kulturen, die 1000 ME.- und 1500 ME.-Na-Salz erhalten hatten. Hier scheint eine Förderung der einzelnen Blattgröße um 6 bis 8 % durch das Hormon erfolgt zu sein (101,5 qcm für die 1000 ME.-Na-Salz Pflanzen pro Blatt im Vergleich zu 94 qcm bei den Alkalikontrollen), doch besaßen gerade diese Pflanzen nur 37 statt 39 Blätter, so daß, wie aus der vierten Kolonne der Tabelle hervorgeht, die Größe der assimilierenden Fläche für die ganze Pflanze durchaus mit den Werten, die für die Kontrollpflanzen ermittelt worden waren, übereinstimmte. Den höchsten Wert für die gesamte Blattoberfläche zeigten die α-Kristallisatpflanzen, doch liegt

[1] *D. E. H. Frear*, Photoelectric apparatus for measuring leaf areas. Plant Physiol. **10**, 569, 1935.

der Wert von 3870 qcm nur um 3% über dem der Wasserkontrolle (3760) und fällt völlig in die Fehlergrenzen. *Eine Förderung der vegetativen Entwicklung war in keiner Weise eingetreten.*

Zusammenfassung.

1. Chrysanthemen der Sorte „Majestic" konnten in der Entwicklung ihrer Knospen und Blüten weder durch Gaben von technischem Progynon noch von reinem Kristallisat und seinem Na-Salz beeinflußt werden.

2. Auch auf die Länge der Pflanzen übte das Hormon keinen Einfluß aus. Die Blattgröße wurde durch 1000 und 1500 ME. Na-Salz um 6 bis 8% vergrößert; da die Pflanzen dieser Serien jedoch nur 37 statt 39 Blätter ausgebildet hatten, war eine Vermehrung der gesamten Blattoberfläche pro Pflanze durch Hormon nicht erzielt worden.

Herrn Professor Dr. *W. Schoeller*, Berlin, Herrn Professor Dr. *A. Butenandt*, Danzig und vor allem der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* bin ich für die Förderung der Untersuchungen zu ergebenstem Dank verpflichtet.

Studien zur Biuretreaktion der Proteine[1].

Von

Fritz Lieben und Hans Jesserer.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 11. Februar 1936.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Biuretreaktion der Proteine wurde von *Rose* im Jahre 1833 zum erstenmal beschrieben. In der Folge wurde die Reaktion stets in engem Zusammenhange mit der Farbreaktion des Biurets selbst behandelt. Sie wurde früher nur *qualitativ* angestellt und daraus ergaben sich die zum Teil widerspruchsvollen Angaben über ihren Ausfall bei verschiedenen Stoffen.

So ist für die folgenden Ergebnisse bemerkenswert, daß bereits *Hofmeister*[2] hervorhebt, daß die Biuret-Reaktion (BR.) für Proteine und Peptone trotz eventueller quantitativer Unterschiede wesensgleich ist. *Neumeister*[3] polemisiert gegen diese Ansicht und erörtert dann die Methodik der Ausführung und die Empfindlichkeitsgrenze. *Kühne*[4] hebt gleichfalls die höhere Intensität der BR. bei den Peptonen gegenüber der bei den Albumosen hervor und gibt eine Tabelle der Farbnuancen bei verschiedenen Eiweißabbauprodukten je nach der zugesetzten $CuSO_4$-Menge. — Der Frage, was für niedermolare Stoffe bzw. Stoffgruppen die BR. geben, trat *Schiff*[5] in mehreren umfangreichen Arbeiten näher, zu denen auch *E. Fischer*[6] gelegentlich Stellung nimmt. *Schiff* führt die Substrate der Reaktion auf drei Grundtypen zurück; das Biuret selbst $NH<\begin{matrix}CO\,.\,NH_2\\CO\,.\,NH_2\end{matrix}$, das Oxamid $\begin{matrix}CONH_2\\|\\CONH_2\end{matrix}$ und das Malonamid $CH_2<\begin{matrix}CONH_2\\CONH_2\end{matrix}$. Bei den Proteinen sollen „mindestens zwei freie, nicht substituierte Amidogruppen vorhanden sein müssen, welche nebst den zugehörigen CO- oder -C=NH-Gruppen nicht an einen Kohlenstoffring, sondern an ein einziges C-Atom in offener Kette an Amidocarbonyle gebunden sind". *Schiff* gibt auch Formeln an für den Kupferbiuretfarbstoff, in dem ein Cu-Atom auf zwei Moleküle Biuret kommt. *Ley*[7] bestätigt diese Formeln, beschreibt aber weitere Produkte (1 Cu : 1 Mol Biuret) und neuerdings befaßt sich *Traube*[8] mit der Theorie der Entstehung und Konstitution niedermolarer biuretähnlicher Kupferkomplexe, ferner mit der chemischen

---

[1] Über einen Teil der Ergebnisse wurde auf dem 15. Internat. Physiologenkongreß in Leningrad berichtet. — [2] *F. Hofmeister*, H. **2**, 288 (bes. S. 293), 1878; **4**, 253 (bes. S. 256), 1880. — [3] *R. Neumeister*, Zeitschr. f. Biol. **26**, 324, 1890, dort auch ältere Literatur. — [4] *W. Kühne*, ebenda **29**, 308, 1892. — [5] *H. Schiff*, B. **29**, 298 u. 1354, 1896; A. **299**, 236, 1897; **319**, 300, 1901; **352**, 73, 1906. — [6] *E. Fischer*, B. **35**, 1095 (bes. S. 1105), 1902. — [7] *H. Ley* u. *F. Werner*, B. **46**, 4040, 1913. — [8] *W. Traube* und Mitarbeiter B. **63**, 2094, 1930; **68**, 1399 u. 1405, 1935.

Veränderung des *Seidenfibroins* bei Anstellung der BR., wobei in dem Reaktionsprodukt auf ein Atom Cu 3,7 Atome N des Eiweißkörpers entfallen.

Was Bausteine oder Gruppen der Proteine als eventuelle Träger der Biuretreaktion betrifft, so hat *Herzog*[1] besonders dem Histidin eine solche Rolle zugeschrieben. *Tomita*[2], der Oxyaminoverbindungen in bezug auf violette Farben mit alkalischen Cu-Salzen untersuchte und klassifizierte, meint gerade den Oxyaminosäuren (Serin, Oxyglutaminsäure) eine Funktion bei der BR. der Proteine zuschreiben zu sollen.

Für einen Fortschritt unserer Kenntnisse dieser besonders bei den Proteinen ihrem Wesen nach noch so wenig geklärten Reaktion war eine einheitliche Art der Anstellung Voraussetzung. Hier lagen Angaben über eine quantitative Methodik von *Riegler*[3] und neuerdings von *Fine*[4] vor. Letzterer konstatiert auch die für uns (s. u.) interessante Tatsache, daß *gleiche Gewichtsmengen* von Serumalbumin und -globulin eine gleich starke BR. liefern.

I.

1. Wir verwendeten zunächst (nach *Riegler*) eine 5%ige Lösung von Casein (*Hammarsten*) in 3%iger NaOH* und $CuSO_4$ (krist. *Kahlbaum*) in 20%iger Lösung. Bei wechselnden Mengen der Eiweißlösung und gleichem $CuSO_4$-Zusatz ließ sich für die Farbstärke der BR. die Gültigkeit des *Beer-Lambert*schen Gesetzes nachweisen. Z. B.:

2,5 bis 25 ccm 5%ige Caseinlösung in 3%iger NaOH + je 5 ccm 20%ige $CuSO_4$. Alle Ansätze werden mit 3%iger NaOH auf 100 ccm aufgefüllt, so daß die Eiweißlösung schließlich 0,5%ig wird, und vom ausgeschiedenen $Cu(OH)_2$ filtriert. Die Kolorimetrie im *Duboscq*-Kolorimeter ergab gut proportionale Farbstärken. Dasselbe war mit 5%igen Lösungen von Peptonum siccum (*Witte*, Rostock) und Gelatine in 3%iger NaOH der Fall.

Wird umgekehrt die Eiweißmenge konstant gehalten und der $CuSO_4$-Zusatz variiert, so erhält man *gleiche* Farbstärken.

Der $CuSO_4$-Zusatz darf allerdings nicht unter 2 ccm pro 100 ccm in der Probe sinken. Andererseits hat auch ein bedeutender Überschuß von $CuSO_4$ keinen Einfluß auf die Farbstärke.

2. Es wurden nunmehr gleich konzentrierte Lösungen der Eiweißkörper bereitet und 1. die BR. durch Zusatz der gleichen Menge 20%iger $CuSO_4$ bis zur bleibenden Niederschlagsbildung angestellt, 2. der Prozentgehalt an Cu in den fertigen Proben nach Filtration bestimmt. Das Letztere geschah derart, daß 10%ige H_2SO_4 bis zum

---

[1] *R. O. Herzog*, H. **37**, 248, 1902. — [2] *M. Tomita*, H. **158**, 42, 1926 und spätere Abhandlung s. bes. H. **201**, 38, 1931 und **211**, 38, 1932. — [3] *E. Riegler*, Zeitschr. f. anal. Chem. **53**, 242, 1914. — [4] *J. Fine*, Biochem. J. **29**, 799, 1935, dort auch Literatur; vgl. zur Methodik auch *H. Kühl*, zitiert nach Chem. Centralbl. **1930**, II, 1893. — * Die Verwendung der 3%igen NaOH ist wichtig, um von etwaigen Störungen des p_H möglichst unabhängig zu sein.

Verschwinden der Biuretfärbung zugesetzt und dann durch konz. NH_3 die tiefblaue Cu-Komplexfarbe erhalten wurde. Diese wurde schließlich im Kolorimeter mit einer $CuSO_4$-Lösung als Standard verglichen, die in 1 ccm 5 mg Cu enthielt und der die gleiche Menge konz. NH_3 zugesetzt worden war: z. B. 5 ccm Filtrat vom $Cu(OH)_2$ + 2 ccm 10 %iger H_2SO_4 + 1 ccm konz. NH_3.

Tabelle I.

Eiweißkörper, 0,5 %ige Lösungen in 3 %iger NaOH	Farbstärke	Farbton	Cu-Gehalt in % (pro 0,5 g Eiweiß)
Casein (*Hammarsten*)	gleich	rotviolett	0,058
Gelatine	„	„	0,057
Eiereiweiß	„	„	0,060
Fibrin (*Merck*)	„	„	0,062
Edestin (*Roche*)	„	„	0,059
Zein (B. D. H.)	„	„	0,059
Witte-Pepton	„	„	0,059
Seidenpepton (*Roche*)	„	„	0,059
„Oxyprotsulfonsäure“	„	„	0,059
Desaminocasein	„	„	0,058

Die Tabelle ergibt das auf den ersten Blick überraschende Resultat, daß sämtliche Eiweißkörper und -derivate trotz weitgehender Verschiedenheit der Molekulargröße und des Gehalts an Aminosäuren *bei gleicher Gewichtskonzentration die gleiche Farbstärke* zeigen. Auch der rotviolette Farbton ist in allen untersuchten Stoffen bis auf geringe Schwankungen derselbe. Bei starker *Eigenfarbe* wird allerdings die Kolorimetrie unsicher, wie z. B. beim Seidenpepton: wir verglichen dann im *Walpole*schen Komparator. Wird die Eigenfarbe stärker, wie bei den *Desaminoproteinen*, so läßt sich eine BR. bei obigem Ansatz überhaupt nicht quantitativ beurteilen, worauf auch die schwankenden Angaben in der Literatur zurückzuführen sind.

So bemerkt *Skraup*[1], allerdings unter Hinweis auf die Eigenfarbe, daß Desaminocasein *keine* BR. liefert, Desaminoglutin hingegen die Reaktion ebenso intensiv gibt wie Glutin selbst, „nur mehr rotstichig“; rotstichig sei auch die Farbe bei den Caseinpeptonen. Desaminoalbumin gibt die BR. „vielleicht nicht“. Nach *Dunn* und *Lewis*[2] zeigt Desaminocasein eine BR. „not characteristic ranging from a pink to a reddish purple“. Positive Angaben finden sich bei *Lewites*[3] „bei richtiger Behandlung“ für Desaminoalbumin, -casein und -glutin; ebenso bei *Treves* und *Salomone*[4]. Neuerdings beschreibt *Steudel*[5] die BR. beim Desaminocasein als „schwach positiv“ unter Erwähnung der Schwierigkeit wegen der Eigenfarbe.

[1] *Zd. H. Skraup* u. Mitarbeiter, M. **27**, 631, 653 u. 663, 1906; A. **351**, 379, 1906. — [2] *M. S. Dunn* u. *H. B. Lewis*, J. of biol. Chem. **49**, 327 (s. spez. S. 331), 1921; vgl. auch *H. B. Lewis* u. *H. Updegraff*, ebenda **56**, 405 (s. Tabelle S. 407), 1923. — [3] *S. Lewites*, H. **43**, 202, 1904. — [4] *Z. Treves* u. *G. Salomone*, diese Zeitschr. **7**, 11, 1907. — [5] *H. Steudel* u. Mitarbeiter, H. **183**, 168, 1929; **187**, 203, 1930.

3. Wir bereiteten das Desaminocasein nach der Vorschrift von *Dunn* und *Lewis*; der N-Gehalt des Produktes nach *Kjeldahl* war 10,6 bis 11,2 %, der Amino-N nach *Van Slyke* war nicht 0, sondern betrug 12,4 mg pro 1 g; unser Produkt war also offenbar weiter abgebaut worden als das der amerikanischen Autoren. Um nun die die Ausführung der BR. unmöglich machende braunrote Färbung der Produkte in Lösung zu beseitigen, bedienten wir uns der *Entfärbung durch Natriumhyposulfit*, wobei der N-Gehalt unverändert bleibt. Diese — sicher noch verbesserungsfähige — Methode dürfte in ähnlichen Fällen auch anderwärts brauchbar sein.

Das aus 50 g Casein (*Hammarsten*) hergestellte gelbe Desaminoderivat wird, nicht getrocknet, in 400 ccm 3 %iger NaOH gelöst und mit 200 g $Na_2S_2O_4$ (techn.) in 800 ccm Wasser versetzt; die Mischung wird 48 Stunden geschüttelt, dann 48 Stunden in fließendem Wasser dialysiert. Das Produkt wird mit HCl ausgefällt, durch Dekantieren gewaschen und zentrifugiert; es ist nunmehr rein weiß und löst sich in 3 %iger NaOH mit schwach brauner Farbe, so daß ein Vergleich der BR. im Kolorimeter und *Walpole*schen Komparator angestellt werden kann. Da etwas Eigenfarbe noch immer störend bemerkbar war, wurden außerdem noch Messungen mit dem Stufenphotometer vorgenommen (s. unten).

4. Die „Oxyprotsulfonsäure" wurde nach *Lieben* und *Bauminger*[1] durch Oxydation von Casein mit $KMnO_4$ hergestellt; ihre Lösung läßt sich direkt der Kolorimetrie mit Hilfe des *Walpole*-Komparators unterwerfen.

5. Ein weiteres bemerkenswertes Resultat der Tabelle I ist die *Gleichheit des Cu-Gehalts in den Ansätzen sämtlicher Proteine und Proteinabkömmlinge*.

6. Wir entnehmen der Tabelle I ferner, daß auch *Peptone* bei gleicher Gewichtsmenge eine nach Farbstärke und -ton den Proteinen *gleiche* BR. aufweisen, entgegen den zahlreichen Angaben der Literatur, die auf qualitativ angestellten Biuretansätzen beruhen. Um diese Beobachtung zu stützen, haben wir die BR. im *Verlaufe der Verdauung von Fibrin* verfolgt.

Es wurden angesetzt: 200 g Fibrin (*Merck*) und 6 g Pepsin (DAB 6 *Kahlbaum*) (vom Milchzucker durch Dialyse befreit) in 2,5 Liter Puffer KCl—HCl, p_H 1,8 + Toluol im Brutschrank bei 38°. Im Verlauf von 27 bis 157 Stunden wurden sechsmal Proben entnommen, der N-Gehalt nach *Kjeldahl* ermittelt und die BR. mit der von unverdauten Fibrinlösungen *gleichen N-Gehalts* verglichen. Die Farbreaktionen (20 ccm Verdauungsflüssigkeit + 2 ccm 30 %ige NaOH + 2 ccm 20 %ige $CuSO_4$-Lösg.) waren einander *in allen Fällen paarweise gleich*.

7. Besondere Beachtung erfordert das Verhalten des *Caseinpeptons* (*Roche*) (N-Gehalt 11,2 %). Bei Ansatz der Biuretreaktion, analog wie

[1] *F. Lieben* u. *B. Bauminger*, diese Zeitschr. **261**, 387, 1933; dort auch ältere Literatur.

bei den Stoffen der Tabelle I, war hier der Farbton *blau* und die Farbstärke im Verhältnis von etwa 10 : 15 *schwächer*. Das Präparat wurde nun der Dialyse in fließendem Wasser unterworfen. Nach 7, 32 und 71 Stunden wurde die BR. angestellt, wobei die Proben im Komparator sowie im Stufenphotometer (s. u.) untersucht wurden. Es ergab sich, daß die Dialyse *niedermolare Anteile* entfernt hatte, die die blaue Komplexfarbe der Aminosäuren zeigen, und daß die zurückgebliebenen höhermolaren Anteile des Peptons die *quantitativ gleiche* BR. aufweisen, wie sämtliche oben angeführten Stoffe.

II.

Der zuletzt angeführte Versuch sowie sonstige inzwischen gemachte Erfahrungen deuteten darauf hin, daß die Farbe der BR. nicht einheitlich violett ist, wie sie sich bei der Ausführung der Reaktion bis zur Ausfällung von $Cu(OH)_2$ darstellt, sondern daß sie aus einer roten und einer blauen Komponente in wechselndem Verhältnis besteht, deren jede für sich unter bestimmten Versuchsbedingungen reproduzierbar ist.

1. Die Biuretfarbe wird durch Ansäuern bekanntlich zerstört; das ganze Cu geht dabei in Ionenform über und kann, im Gegensatz zu dem komplex gebundenen Cu des alkalischen Biuretansatzes, durch $K_4Fe(CN)_6$ ausgefällt werden. Mit NH_3 wird die tiefblaue Farbe der komplexen Tetramminverbindungen erhalten, was oben zur Cu-Bestimmung verwendet wurde; durch NaOH oder $Ba(OH)_2$ aber tritt das Cu wieder in den Biuretkomplex unter Herstellung der ursprünglichen violetten Farbe ein. — Nimmt man nun den Säurezusatz *etappenweise* vor, indem man z. B. n H_2SO_4 tropfenweise dem violetten Biuretansatz zufügt, so wird die rote Farbkomponente immer schwächer und verschwindet schließlich bei einem bestimmten p_H (ungefähr 8 bis 9) vollkommen. Die Farbe ist sodann rein blau.

2. Um hier Klarheit zu gewinnen, gingen wir dazu über, die Biuretfarbe der Proteine im *Pulfrich*schen *Stufenphotometer* unter Verwendung eines blauen und eines roten Lichtfilters (S 47 bzw. 72) zu untersuchen.

Ansatz: Je 10 ccm 1%ige Caseinlösung in 3%iger NaOH wurden mit steigender Tropfenzahl einer 5%igen $CuSO_4$-Lösung versetzt und alle Ansätze mit Wasser auf gleiches Volumen gebracht. — In der so gewonnenen Abbildung sind die Extinktionskoeffizienten als Ordinate, die Tropfenzahl des zugesetzten $CuSO_4$ als Abszisse aufgetragen.

Die Abb. 1 zeigt uns zwei gerade Linien, die miteinander einen Winkel bilden; die Extinktionskoeffizienten der roten Komponente nehmen mit steigendem Cu-Zusatz rascher zu als die der blauen Komponente. Wichtig ist ferner, daß die blaue Komponente erst bei

der Tropfenzahl 5 ihren Ursprung nimmt, während bei geringerem Cu-Zusatz *die Biuretfarbe rein rot ist.* — Es ergibt sich also, daß das *quantitative Verhältnis der beiden Komponenten abhängig ist einmal vom* p_H, *dann von der Menge des Cu-Zusatzes.*

Man könnte denken, daß die Farbverschiebung durch den Cu-Zusatz lediglich auf die saure Reaktion des $CuSO_4$ zurückzuführen ist, das p_H also das *allein* Maßgebende für das Farbkomponentenverhältnis sei. Dem ist aber nicht so, denn dieselbe Farbverschiebung zugunsten der blauen Komponente findet beim Auflösen zunehmender Mengen von $Cu(OH)_2$ in der alkalischen Eiweißlösung statt.

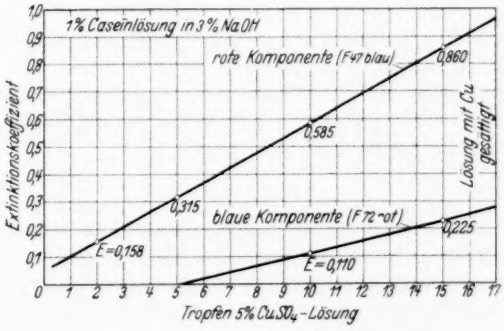


Abb. 1.

3. Eine Verschiebung des Komponentenverhältnisses *nach Rot* findet auch statt, wenn die BR. mit Lösungen desselben Eiweißkörpers *verschiedenen Alters* angesetzt wird. Eine frisch bereitete Caseinlösung zeigt noch nicht den „richtigen" Farbton, vielmehr eine Farbe mit höherem Blaugehalt. Steht die Lösung etwa 24 Stunden, so tritt beim Anstellen der Reaktion der „richtige" vergleichbare Farbton auf. Bei einer *Witte*-Peptonlösung ist derselbe sofort in der alkalischen Lösung zu erzielen.

4. Werden nach der oben beschriebenen Methode angesetzte fertige Biuretproben (10 ccm 1 %ige Caseinlösung in 3 %iger NaOH mit zunehmender Tropfenzahl 5 %iger $CuSO_4$) durch Zusatz von 3 %igem NaOH verdünnt, so sinkt die Farbstärke natürlich proportional der Verdünnung, der Farbton aber bleibt unverändert. Nimmt man aber die Verdünnung mit der 1 %igen Caseinlösung vor, so verschiebt sich der Farbton der Ansätze *wieder nach Rot.* Wir stellten mit Hilfe von Kolorimeter und Stufenphotometer fest, daß sich stets der gleiche Farbton, d. h. dasselbe Gleichgewicht zwischen den beiden Farbkomponenten herstellt, wenn der Cu-Gehalt pro ccm Ansatz derselbe ist. Dabei ist es gleichgültig, ob die Cu-Konzentration durch Zusatz von $CuSO_4$ zu

Ansätzen mit niederem Cu-Gehalt oder durch Verdünnung von Ansätzen mit höherem Cu-Gehalt hergestellt wird.

5. Die so gewonnenen Erfahrungen legten die weitere Frage nahe, ob in den in Tabelle I wiedergegebenen gesättigten violetten Ansätzen von gleicher Farbstärke und gleichem Farbton auch die *rote Komponente allein* überall gleich stark ist. Es wurden also die Ansätze im Stufenphotometer mit Hilfe des blauen Filters (47) verglichen.

Tabelle II.

Eiweißkörper, 0,5 %	Extinktionskoeffizient	Eiweißkörper, 0,5 %	Extinktionskoeffizient
Casein	0,516	Zein	0,487
Eiereiweiß	0,470	*Witte*-Pepton . .	0,474
Edestin	0,502		

Wir sehen, daß auch die *Farbstärke* (Lichtdurchlässigkeit) der *Rotkomponente* in allen gleich konzentrierten Proteinlösungen innerhalb einer gewissen Fehlerbreite *die gleiche* ist.

III.

1. Es ist nunmehr die Frage: Was ist das chemische Substrat dieser beiden Farben bzw. wie unterscheiden sich die Cu-Bindungen in beiden Fällen? Dieses Problem konnte zwar nicht vollständig geklärt werden, doch ergaben sich einige bemerkenswerte Gesichtspunkte. Wir dachten zuerst, daß die *rote* Farbe auf der Bindung der Cu-Atome an zwei oder mehrere N-Atome beruht, die *blaue* Farbe aber eine Komplexfarbe des Cu darstellt, wie sie *Pfeiffer* in den Cu-Verbindungen der Aminosäuren formuliert, wobei Kupfer sowohl an den Stickstoff als auch an die COOH-Gruppen gebunden wäre. Schon die oben erwähnten Beobachtungen der *Farbverschiebung* nach Rot beim Altern der Eiweißlösung bzw. beim Verdünnen der Eiweißbiuretprobe mit Eiweißlösung sind aber mit dieser Annahme schwer vereinbar. Es müßte ein *Bindungswechsel* der Cu-Atome eingetreten sein, ohne daß irgendein chemischer Eingriff stattgefunden hätte. — Am wenigsten Schwierigkeiten begegnet eine andere Annahme: Die rote Farbe tritt dann auf, wenn die Zahl der Cu-Atome im Vergleich zu der Zahl der verfügbaren N-Atome gering ist, das Cu also *viele* Valenzkräfte betätigen muß; die blaue Farbe aber erscheint dann, wenn das Verhältnis der Zahl der Cu-Atome zum verfügbaren N *höher* wird, also weniger Valenzen des einzelnen Cu in Aktion zu treten brauchen. Dies ergibt sich zwanglos aus den Ergebnissen von II/2 (steigender Cu-Zusatz zur gleichen Eiweißlösung: Verschiebung nach Blau) und II/4 (Verdünnung des Biuretansatzes durch Eiweißlösung: Verschiebung nach Rot)[1]. Wir haben also ein

[1] Eine gewisse Analogie zu dieser Annahme findet sich in den Vorstellungen von den „Räumlichen Verhältnissen um das Kupferatom" von *N. Schlesinger* (B. **58**, 1877, 1925). Für die Cu-Salze der Äthylen- und Tri-

von der Cu-Menge im Eiweiß abhängiges Gleichgewicht. Der Einfluß des p_H auf dasselbe könnte vielleicht mit Verschiebungen im Keto-Enol-gleichgewicht bei den Peptidbindungen der Proteinkette zusammenhängen.

2. Um hier mehr Einsicht zu gewinnen, gingen wir daran, die *Zahl der verfügbaren N-Atome im Eiweiß durch Methylierung zu verringern.* Wir arbeiteten mit Dimethylsulfat nach der Vorschrift von *Edlbacher*[1] und benutzten Edestin (*Roche*) und Casein (*Hammarsten*) als Substrate. Die folgenden Methoxyl- und Methylimidbestimmungen wurden von Dr. *O. Watzlawek* im hiesigen Institut ausgeführt, wofür wir ihm bestens danken.

Das Methyledestin hatte einen N-Gehalt von 11,8%, am N waren: 2,42% CH_3, am O: 1,6% CH_3 gebunden; die Methylzahl nach *Edlbacher* (Zahl der Methylgruppen pro 100 Atome N) wäre demnach 19. Nun kommen aber sicher nicht alle N-Atome für die Reaktion mit Cu in Betracht. Man kann fürs erste annehmen, daß nur der Peptid-N hierfür zur Verfügung steht; dann wären $^3/_4$ vom Arginin-N, $^1/_2$ vom Lysin-N, $^2/_3$ vom Histidin-N und $^1/_2$ vom Tryptophan-N, ferner der N des Prolins und des Oxyprolins vom Gesamt-N abzuziehen. Diese Werte sind für das Edestin leidlich bekannt, nicht aber für das Methyledestin. Wir mußten uns zunächst damit begnügen, die abzuziehenden N-Werte im Verhältnis der Reduktion des Gesamt-N bei der Methylierung gleichfalls zu verkleinern. Es wären dann 8,6% Peptid-N verfügbar und die Methylzahl würde sich auf 26 erhöhen. Nimmt man, was wahrscheinlich ist, an, daß auch die ε-Aminogruppe des Lysins einfach methyliert wird, so haben wir 8,9% Peptid-N und die Methylzahl wird 25.

Sind also von 100 Peptid-N-Atomen 25% besetzt, so müßte die gesättigte Biuretfarbe um 25% herabgesetzt sein. Tatsächlich wurde im Kolorimeter eine Abnahme von 20% festgestellt, die — nach Messung im Stufenphotometer — auch für die beiden Komponenten ungefähr denselben Betrag ausmacht. Wir haben eine Übereinstimmung der Größenordnung nach, was ja bei der Unsicherheit obiger Berechnung nicht anders zu erwarten war. Auch dieses Ergebnis spricht für die in diesem Abschnitt in 1. besprochene *zweite Annahme.*

Das *methylierte Casein* enthielt 12,0% N, CH_3 am N: 3%, am O: 3%, die Methylzahl wäre 23. Errechnen wir nach derselben Art wie beim Edestin die erforderliche Korrektur, so ist der Peptid-N 9,3% und die Methylzahl wäre 30. Rechnet man auch mit einer Monomethylierung der ε-Aminogruppe des Lysins, so haben wir 9,9% Peptid-N bzw. eine Methylzahl von 28. Die gefundene Abnahme der

methylen-bis-(α-Iminosäuren) kennt man nur eine blaue, für die Dekamethylen-bis-(α-Iminosäure) nur eine violette Reihe, s. die Formeln S. 1877. Vgl. auch bei *P. Pfeiffer*, Organische Molekülverbindungen, 2. Aufl. 1927, S. 262. „Parallel mit der Stärke der Nebenvalenzabsättigung geht bei den Kupfersalzen eine Verschiebung der Farbe von Blau durch Violett und Rosa nach Braun . . ."

[1] *S. Edlbacher*, H. **107**, 52, 1919; vgl. auch weitere Abhandlungen von *Edlbacher*, sowie von *J. Herzig*, H. **110**, **111** u. **112**.

Farbkomponenten der BR. des Methylcaseins betrug 28% für die rote, 27% für die blaue Komponente, also eine sehr gute Übereinstimmung.

Bei den *Aminosäuren* setzt Methylierung am N die blaue Cu-Komplexfarbe herab. Äquivalente Lösungen von Glykokoll und Sarkosin zeigen blaue Farben im Stärkeverhältnis 14 : 10; das Betainchlorhydrat gibt keine BR. mehr.

3. Was die *Methoxylzahl* betrifft, so sind die gefundenen Werte im Vergleich zu den im Casein verfügbaren freien COOH- und OH-Gruppen zu *hoch*, wie schon früher beobachtet worden ist[1]. Wahrscheinlich treten auch Peptidbindungen in Enolform hier in Aktion, die ja noch in großer Zahl verfügbar sind. Für den Ausfall der BR. scheint die Besetzung der COOH- und OH-Gruppen durch *Methylierung* belanglos. Man könnte schließen, daß bei Richtigkeit unserer *ersten* Annahme (s. o. 1.) durch die Methoxylierung die blaue Komponente der BR. vollkommen verschwinden müßte, was eben nicht der Fall ist. Doch kann man mit *diesem* Argument diese Annahme nicht ablehnen: Vergleicht man nämlich die Cu-Komplexfarben beim Glykokoll und Glykokoläthylester, so findet man *keinen Farbunterschied*, soweit sich das bei der geringen Löslichkeit des letzteren feststellen läßt.

4. Die Ergebnisse der Methylierung sind aber befriedigend durch die erwähnte zweite Hypothese zu erklären, daß nämlich die Cu-Atome an die N-Atome der Peptidbindungen treten, wobei die rote Komponente eine hohe Valenzbetätigung pro Cu-Atom anzeigt, die blaue eine niedrige. — Es sei hier noch erwähnt, daß unsere Versuche keinerlei Anhaltspunkte für die Annahme liefern, daß *einzelne Bausteine* der Proteine für die BR. verantwortlich sind. Auf Grund der oben zitierten Literaturangaben führten wir die BR. genau nach dem Vorgang wie in Tabelle I aus bei 0,5%igen Lösungen von Biuret, Histidin, Serin, Colamin und β-Asparagin. Nur das *Biuret* gibt die Farbreaktion, und zwar in *gleicher* Farbstärke wie die Proteine, alle anderen Stoffe zeigen unter diesen Versuchsbedingungen eine *rein blaue* Farbe. Bei Anstellung der BR. nach qualitativer Art mit einigen Tropfen $CuSO_4$-Lösung sieht man allerdings einen Farbton von rotstichigem Blau bei Colamin und Serin, den *Tomita* (l. c.) beobachtet hat. Daß gewöhnliches β-Asparagin keine wirkliche BR. gibt, erwähnt schon *E. Fischer* (l. c.).

IV.

Zum Schlusse untersuchten wir noch die Biuretreaktion bei einem Vertreter der *Protamine*. Wir verdanken der Freundlichkeit von Herrn Prof. *Felix* (Frankfurt) die Übersendung von *Clupeinmethylesterchlorhydrat*, für die wir auch hier bestens danken. In dem Präparat ist

[1] Vgl. *J. Herzig*, H. **111**, 223, 1920; s. spez. S. 226.

(nach der Methoxylbestimmung) die COOH-Gruppe verestert; die Mikrochlorbestimmung nach *Carius* ergab einen Gehalt von 10 HCl pro Mol.

Eine 0,6%ige Lösung des Präparats (0,5% Clupein) in 3%iger NaOH ergab, mit 20%iger $CuSO_4$ bis zur bleibenden Ausfällung von $Cu(OH)_2$ versetzt, eine Farbreaktion von gleicher Farbstärke und gleichem Farbton wie eine 0,5%ige Caseinlösung. Die Cu-Bestimmung ergab 0,066% Cu pro 0,5 g Eiweiß, was gleichfalls mit den Zahlen von Tabelle I befriedigend übereinstimmt.

Zur Klärung weiterer Fragen, speziell was die Farbreaktion des Biurets selbst und anderer chemisch nahestehender niedermolarer Stoffe betrifft, sind Versuche im Gange; ebenso zur Frage nach den *quantitativen* Beziehungen zwischen der Zahl der Cu-Atome und der der disponiblen bzw. gebundenen N-Atome. Bei den Proteinen wird es sich auch noch um die Frage handeln, *wieviel Peptidbindungen* im Mol des Eiweißderivates vorhanden sein müssen, damit die Komponenten der BR. auftreten.

Zusammenfassung.

Mit Hilfe einer quantitativen Methodik bei der Ausführung der Biuretreaktion der Proteine konnte eine Reihe von Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden.

1. Die Biuretreaktion wird so angestellt, daß die Eiweißkonzentration im fertigen Ansatz 0,5% beträgt, die verwendete NaOH ist 3%ig, die $CuSO_4$-Lösung, wenn nicht anders angegeben, 20%ig.

2. Die Biuretfarben bei verschiedener Eiweißkonzentration gehorchen dem *Beer-Lambert*schen Gesetz.

3. Farbstärke und Farbton der Biuretansätze sämtlicher untersuchter Proteine und Proteinabkömmlinge (Peptone, Oxyprotsulfonsäure, Desaminocasein) sind *gleich* bei gleicher Gewichtskonzentration der Lösung und unabhängig von der Molgröße und dem Aminosäuregehalt des Substrats. Auch die in den Ansätzen enthaltenen Cu-Mengen erwiesen sich als gleich. — Die Gültigkeit dieser Sätze für Peptongemische wird durch einen Verdauungsversuch mit Fibrin gestützt, wobei die entnommenen Proben farbgleiche BR. mit Proben unverdauten Fibrins gleichen N-Gehalts geben. — Das Caseinpepton gibt die gleiche BR. erst, nachdem es durch Dialyse von niedermolaren Produkten befreit ist. — Substratlösungen mit starker Eigenfarbe können nötigenfalls durch Natriumhyposulfit entfärbt werden und sind dann dem kolorimetrischen Vergleich ihrer BR. zugänglich. Dies wurde mit Erfolg beim Desaminocasein durchgeführt.

4. Die Farbe der BR. der Proteine besteht aus zwei Komponenten, einer blauen und einer roten, die je nach den Versuchsbedingungen auch getrennt reproduzierbar sind. Durch vorsichtiges Ansäuern wird

z. B. die rote Komponente zerstört und die Lösung wird blau. Stärkeres Ansäuern läßt die Farben völlig verschwinden; durch NH_3-Zusatz kann dann die blaue Cu-Komplexfarbe hergestellt werden.

5. Die beiden Farbkomponenten ergeben bei der Untersuchung mit dem Stufenphotometer zwei gegen die Abszisse verschieden stark geneigte Gerade als Verbindungslinien der gemessenen Extinktionskoeffizienten. Wichtig ist, daß die blaue Komponente erst bei einer bestimmten Tropfenzahl der $CuSO_4$-Lösung ihren Ursprung nimmt, während bei geringerem Cu-Zusatz *nur die rote Komponente* besteht. Das Stärkeverhältnis der Komponenten hängt vom Cu-Zusatz ab, daneben auch vom p_H. — Um das „richtige" unveränderliche Farbstärkenverhältnis zu erhalten, muß man die alkalische Eiweißlösung etwas „altern" lassen. Die Farben in einer frischbereiteten Lösung sind stärker blau, als dem späteren Gleichgewicht entspricht. Durch Verdünnen der Biuretansätze mit der benutzten Eiweißlösung tritt eine Farbverschiebung nach Rot ein. — Wir stellten mit dem Stufenphotometer fest, daß die Rotkomponente gleich konzentrierter Eiweiß- und Eiweißderivatlösungen in allen Fällen gleich stark ist, — ebenso wie es bei der gesättigten violetten Farbe der Fall ist.

6. Am zwanglosesten läßt sich der Unterschied der beiden Farbkomponenten durch die Annahme erklären, daß bei roter Farbe der Verbindung ein Cu-Atom eine größere Anzahl von N-Atomen (bzw. Peptidbindungen) absättigt, also eine höhere Valenzzahl betätigt, bei blauer Farbe aber eine kleinere Zahl von N-Atomen bindet. Dies stimmt gut mit den oben wiedergegebenen Erfahrungen, sowie mit den Ergebnissen der Methylierung überein. — Berechnet man aus der Methylimidzahl die Zahl der besetzten, also für das Cu blockierten N-Atome, so ergibt sich eine prozentuelle Verminderung der freien Stellen, die speziell beim Casein recht genau der gefundenen prozentuellen Verminderung der Farbintensität entspricht. Wir nehmen an, daß die Besetzung der OH- oder COOH-Gruppen durch CH_3 (Methoxylzahl) für die BR. belanglos ist.

7. Unsere Versuche geben keinen Anhaltspunkt dafür, daß *einzelne Eiweißbausteine* für die BR. verantwortlich sind oder sie beeinflussen.

8. Versuche mit dem Methylesterchlorhydrat des *Clupeins* ergaben die gleiche Farbstärke, den gleichen Farbton und denselben Cu-Gehalt wie eine gleich konzentrierte Caseinlösung.

Über die Vermehrung der aktiven Amylasemenge im ungekeimten Getreide durch Schwefelwasserstoff und Papain.

Von

Tadeusz Chrzaszcz und **Józef Janicki.**

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Technologie der Universität in Posen.)

(Eingegangen am 11. Februar 1936.)

In einer früheren Arbeit[1] konnten wir feststellen, daß der Abbau des Eiweißes, das die Amylase ungekeimten Getreides angeblich bindet, durch verschiedene proteolytische Enzyme nicht parallel zur Zunahme der aktiven Amylasemenge verläuft. Diese Beobachtung ist insofern wichtig, als sie die Behauptung einer Reihe von Autoren in Zweifel setzt, daß die Vermehrung der aktiven Amylasemenge bei der Einwirkung des Papains auf ungekeimtes Getreide durch den Abbau von die Amylase bindendem Eiweiß erfolgt. Wir gaben deshalb der Ansicht Ausdruck, daß die Vergrößerung der aktiven Amylasemenge nicht ausschließlich auf deren Freiwerden aus Eiweiß oder auf Eiweißabbau beruht, sondern gleichfalls und vielleicht sogar hauptsächlich auf der Bildung oder dem Freiwerden von Faktoren, die die Wirkung der Amylase mobilisieren bzw. aktivieren. Unsere Behauptung stützte sich auf die von uns festgestellte Tatsache, daß einem kräftigen Eiweißabbau nicht immer eine gleich große Zunahme der aktiven Amylasemenge entspricht, und daß bei einigen Getreidearten trotz großen Eiweißabbaues fast keine Zunahme der aktiven Amylasemenge festgestellt werden konnte.

In diesem Sinne war unsere Beobachtung sehr bemerkenswert, daß auch Schwefelwasserstoff eine Vergrößerung der aktiven Amylasemenge im ungekeimten Getreide[2] bewirkt. Auf Grund der Untersuchungen von *B. Mendel* und *Blood*[3], *R. Willstätter* und *W. Grassmann*[4], *W. Grassmann* und *H. Dyckerhoff*[5], aus denen hervorgeht, daß Schwefelwasserstoff eine Aktivierung bzw. Mobilisierung proteolytischer Enzyme pflanzlicher Herkunft bewirkt, sollte man annehmen, daß auch in unserem Falle der Schwefelwasserstoff die Wirkung der sich im ungekeimten Getreide befindenden proteolytischen Enzyme verstärkt bzw. diese Emzyme mobilisiert, wodurch die durch Eiweiß gebundene Amylasemenge frei wird. Andererseits machen es sowohl

[1] *T. Chrząszcz* u. *J. Janicki*, diese Zeitschr. **281**, 408, 1935. — [2] Biochem. J. **30**, 478, 1936. — [3] J. of biol. Chem. **31**, 201, 1910. — [4] Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 184, 1924; **151**, 286, 1926; **152**, 164, 1926. — [5] Ebenda **179**, 41, 1928.

unsere Beobachtungen, daß der Grad des Eiweißabbaues der Vermehrung der aktiven Amylasemenge nicht parallel geht, als auch unsere damit verbundenen Ansichten über die Aktivierung der Amylase erforderlich, den Einfluß des Schwefelwasserstoffs auf Faktoren, welche die Amylasewirkung mobilisieren, in Erwägung zu ziehen. In vorliegender Arbeit soll untersucht werden, ob die Vergrößerung der Amylasewirkung, die unter dem Einfluß des Schwefelwasserstoffs im ungekeimten Getreide stattfindet, dadurch erfolgt, daß dieser Schwefelwasserstoff durch Eiweiß gebundene Amylase freimacht, oder ob er Amylaseaktivatoren mobilisiert und zur Tätigkeit veranlaßt.

Experimenteller Teil.

Zu den Untersuchungen wurden verwendet: sieben verschiedene Gerstensorten, Papain 1 : 100, lösliche Stärke Erg. B. 5 (*Merck*), im *Kipp*schen Apparat entwickelter und gereinigter Schwefelwasserstoff. Der Stickstoff wurde fertig der mit einem Reduktionshahn versehenen Stahlflasche unter Druck entnommen und durch zwei Waschflaschen mit Pyrogallol von Sauerstoffbeimengungen befreit. Die wässerigen und Papain enthaltenden Getreideauszüge wurden wie in der vorhergehenden Arbeit hergestellt, jedoch wurde dauerndes mechanisches Schütteln der erhaltenen Auszüge vermieden, da diese stets eine schwächere amylolytische Kraft besitzen.

Der Schwefelwasserstoff wurde nach Verlassen der Waschflasche in einen dickwandigen, gläsernen Kolben geleitet, in dem sich 25 g gemahlenes Getreide, 150 ccm Wasser und 4 ccm Toluol ohne bzw. mit Papainzusatz befanden. Sobald die Luft durch Schwefelwasserstoff verdrängt war, wurde letzterer noch 20 Minuten lang weiter eingeleitet, wobei der Kolbeninhalt unter Druck in gewissen Zeitabständen geschüttelt wurde; dann wurde der Kolben dicht verschlossen und so 2 bis 20 Stunden lang gehalten. Es wurden mit Schwefelwasserstoff auch fertige, filtrierte Getreideauszüge gesättigt. Die so erhaltenen Auszüge wurden dann entweder direkt filtriert und untersucht, oder es wurde erst der Schwefelwasserstoff mit Hilfe von sauerstofffreiem Stickstoff aus den Auszügen entfernt, — was etwa 2 Stunden dauerte (bis zum Verschwinden der Reaktion auf mit Bleiacetat angefeuchtetes Papier) —, und dann erst wurden diese filtriert und untersucht.

Die Proteolyse wurde durch Bestimmung des löslichen, ferner des mit $MgSO_4$ in saurer Lösung ausfällbaren und des nichtausfällbaren Stickstoffs untersucht, wobei letzterer aus dem Unterschied zwischen gesamtem und ausfällbarem **N** berechnet wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf mg **N** in 1 g Getreide umgerechnet.

Die amylolytische Kraft wurde in den filtrierten Auszügen nach entsprechender Verdünnung (5 : 100 oder 10 : 100) durch Bestimmung der verzuckernden, dextrinierenden und verflüssigenden Funktion erhalten. Da die dextrinierende und die verflüssigende Funktion nur verhältnismäßig geringe Unterschiede zeigte, werden sie in den Tabellen nicht angegeben.

Zunächst handelte es sich um eine vergleichsmäßige Feststellung, welchen Einfluß einerseits Papain, andererseits Schwefelwasserstoff

auf die zubereiteten Getreideauszüge hatten. Dazu wurden zwei verschiedene Gerstensorten verwendet, deren Auszüge auf amylolytische Kraft und Proteolyse untersucht wurden. Zu diesem Zweck wurden folgende Auszüge hergestellt:

Nr. 1: Wässeriger Auszug.
„ 2: Auszug mit Zusatz von 3 g Papain.
„ 3: Auszug mit H_2S.
„ 4: Auszug mit H_2S, entfernt nach 20 Stunden.

Tabelle I.

Auszug Nr.	Verzuckernde Kraft		Auf 1 g Gerste					
			N-löslich		N-ausfällbar mit $MgSO_4$		N-nichtausfällbar mit $MgSO_4$	
	ccm n/20 Jod	Zunahme %	mg	Zunahme %	mg	Zunahme %	mg	Zunahme %
	Gerste Nr. 1.							
1	192	—	2,735	—	1,392	—	1,343	—
2	377	+ 96	6,245	+ 129	2,033	+ 46	4,212	+ 214
3	432	+ 124	2,928	+ 7,6	1,442	+ 3,6	1,486	+ 10
4	190	0,0	2,871	+ 4,9	1,421	+ 2,0	1,450	+ 7
	Gerste Nr. 2.							
1	278	—	2,637	—	1,640	—	0,997	—
2	465	+ 67,3	7,098	+ 169	2,142	+ 27,5	4,956	+ 400
3	559	+ 101	3,150	+ 19,4	1,588	— 5,5	1,562	+ 56,7
4	286	+ 3,0	3,192	+ 21,0	1,619	— 6,0	1,573	+ 57,9

Das Zahlenmaterial der obigen Tabelle zeigt, daß Schwefelwasserstoff in beiden Auszügen die aktive Amylasemenge sehr erheblich und sogar in höherem Maße vermehrt, als dies bei der Einwirkung des Papains festgestellt wird, trotzdem die Proteolyse hier nur wenig größer als im wässerigen Gerstenauszug ist. Ferner zeigen die Zahlen, daß trotz 15- bis 20stündiger Einwirkung des Schwefelwasserstoffs die amylolytische Kraft auf die ursprüngliche Höhe im wässerigen Gerstenauszug zurückgeht, wenn dieser Schwefelwasserstoff vor der Filtrierung aus der Lösung durch O_2-freien Stickstoff entfernt wird. Daraus würde folgen, daß die Vergrößerung der amylolytischen Kraft des Gerstenauszuges vollständig oder fast vollständig von der Proteolyse unabhängig ist, daß sie dagegen von einem gewissen Faktor abhängt, dessen Einwirkung durch Schwefelwasserstoff mobilisiert wird.

Um dieses Problem zu untersuchen, wurden Versuche mit Gerste Nr. 3 durchgeführt und folgende Auszüge hergestellt:

Nr. 1: Wasserauszug, erhalten im Verlauf von 20 Stunden.
„ 2: Wasserauszug, sofort mit Schwefelwasserstoff gesättigt und unter dessen Druck etwa 20 Stunden gehalten.

Nr. 3: Wasserauszug wie Nr. 2, nach Filtrierung H_2S durch Stickstoff entfernt.

„ 4: Wasserauszug wie Nr. 2, nach 20 Stunden wie gewöhnlich Papain (2%) zugegeben, dann filtriert und H_2S mit Stickstoff entfernt.

„ 5: Wasserauszug wie Nr. 3, von neuem 20 Minuten lang mit H_2S behandelt, unter dessen Druck 2 Stunden lang gehalten und dann untersucht.

„ 6: wie Nr. 1, darauf filtriert, 20 Minuten lang mit H_2S gesättigt und unter dessen Druck 7 Stunden gehalten.

„ 7: Wasserauszug wie Nr. 1, nach Filtrierung 2% Papain zugegeben und 7 Stunden belassen.

„ 8: wie Nr. 3, 2% Papain zugefügt und 7 Stunden lang belassen.

Tabelle II.

Auszug Nr.	Verzuckernde Kraft		Auszug Nr.	Verzuckernde Kraft	
	ccm n/20 Jod	Zunahme %		ccm n/20 Jod	Zunahme %
1	296	—	5	879	+ 196
2	884	+ 198	6	390	+ 31,0
3	307	+ 3,6	7	374	+ 26,0
4	447	+ 51,0	8	483	+ 66,6

Aus Tabelle II geht hervor, daß die Beseitigung des Schwefelwasserstoffs aus dem filtrierten Auszug einen Rückgang der amylolytischen Kraft auf den Wert bewirkt, welcher im reinen Wasserauszug festgestellt wurde (Nr. 3 und 1). Dieser Umstand weist darauf hin, daß der die Amylasewirkung mobilisierende Faktor aus der Gerste in den Auszug geht, daß seine Aktivität sich jedoch nur in Gegenwart bzw. in Verbindung mit dem Schwefelwasserstoff erhält. Wenn man einen solchen Auszug, dessen Aktivierung durch Entfernung des Schwefelwasserstoffs rückgängig gemacht wurde, von neuem mit Schwefelwasserstoff sättigt und unter dessen Einwirkung beläßt, so erhält er wieder seine höchste amylolytische Kraft zurück. Daraus folgt, daß die Aktivierung durch Schwefelwasserstoff eine umkehrbare Reaktion ist. Ferner zeigt sich, daß die die Amylase aktivierende Substanz aus der Gerste in die wässerige Lösung in geringer Menge übergeht, in großer Menge dagegen ausschließlich in Gegenwart des Schwefelwasserstoffs. Schließlich sieht man, daß das zugefügte Papain die aktivierende Substanz nur in geringem Maße vor der Inaktivierung schützt, sobald der Schwefelwasserstoff entfernt wird. Das Papain ist demnach nicht imstande, gegenüber dieser Substanz die Rolle des Schwefelwasserstoffs zu ersetzen.

Um zu prüfen, ob sich andere Gerstensorten ähnlich verhalten, wurden weitere Versuche mit vier anderen Gerstensorten durchgeführt und zu diesem Zwecke folgende Lösungen hergestellt:

Nr. 1: Wässeriger Gerstenauszug, erhalten im Verlauf von 20 Stunden.
„ 2: Wässeriger Gerstenauszug mit 2 % Papainzusatz, erhalten im Verlauf von 20 Stunden.
„ 3: Wässeriger Gerstenauszug, wie Nr. 1, aber nach Filtrierung 20 Minuten mit H_2S gesättigt und 2 Stunden lang so gehalten.
„ 4: Wässeriger Gerstenauszug, wie Nr. 2, aber nach Abfiltrierung 20 Minuten lang mit H_2S gesättigt und so 2 Stunden gehalten.
„ 5: Wässeriger Gerstenauszug, sofort mit H_2S gesättigt und so 15 Stunden gehalten.
„ 6: Wässeriger Gerstenauszug, mit 2 % Papainzusatz, sofort mit H_2S gesättigt und unter dessen Einwirkung 15 Stunden gehalten.
„ 7: Wässeriger Gerstenauszug, wie Nr. 5, aber nach 15 Stunden H_2S durch Stickstoffstrom beseitigt.

Tabelle III.

Auszug Nr.	Gerste Nr. 4		Gerste Nr. 5		Gerste Nr. 6		Gerste Nr. 7	
	Verzuckernde Kraft		Verzuckernde Kraft		Verzuckernde Kraft		Verzuckernde Kraft	
	ccm n/20 Jod	Zunahme %	ccm n/20 Jod	Zunahme %	ccm n/20 Jod	Zunahme %	ccm n/20 Jod	Zunahme %
1	249,6	—	253,8	—	176,8	—	236,6	—
2	416,0	66,7	514,8	102,1	405,6	129,3	462,8	95,6
3	426,4	70,1	592,8	132,8	462,8	161,9	442,0	86,8
4	514,8	106,3	832,0	234,7	852,8	382,3	520,0	119,8
5	507,0	103,1	780,0	214,3	785,2	344,1	548,6	131,8
6	551,2	120,1	—	—	899,6	411,7	548,6	131,8
7	248,0	0,0	253,8	0,0	182,0	3,0	241,8	2,0

Aus Tabelle III läßt sich ersehen, daß die Aktivierung der filtrierten Auszüge obiger vier Gerstensorten durch Schwefelwasserstoff überall groß und sogar höher ist als bei den vorher verwendeten Gerstensorten. Diese Aktivierung ist jedoch niedriger als bei den nichtfiltrierten Gerstenauszügen, was darauf hinweist, daß der Aktivator bzw. die Amylase in nicht aktiver Form in die Lösung in verschiedener Menge — je nach der Qualität der untersuchten Gerstensorte — übergeht, daß jedoch ein bedeutender Teil dieses Aktivators bzw. der inaktiven Amylase in der Gerste verbleibt und nur unter dem Einfluß des H_2S in die wässerige Lösung übergehen kann. Das Zusammenwirken von H_2S und Papain bei der Zubereitung der Auszüge bewirkt nur eine etwas höhere Aktivierung als Schwefelwasserstoff allein. Dagegen zeigt die Einwirkung von Papain allein bei der Gerste eine geringere Vermehrung der amylolytischen Kraft des Auszuges,

als dies bei der Aktivierung durch H_2S allein der Fall ist. In allen Fällen bewirkt bei den untersuchten Gerstensorten die Vertreibung des H_2S aus dem Gerstenauszug durch einen O_2-freien Stickstoffstrom ein vollständiges Zurückgehen der Aktivierung bis zur ursprünglichen amylolytischen Kraft des reinen Wasserauszugs aus der Gerste, die dann nicht weiter geändert werden kann.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Ansicht, daß die Amylase im Getreide durch Eiweiß gebunden ist und durch Proteolyse frei wird, wurde in der Literatur im allgemeinen auf Grund der von *J. S. Ford* und *J. M. Guthrie*[1] festgestellten Tatsache anerkannt, daß durch die Einwirkung von Papain auf Gerste die aktive Amylasemenge vermehrt wird. Die Untersuchungen anderer Autoren, wie *J. H. Baker* und *H. E. Hulton*[2], *J. Weichherz* und *H. Asmus*[3], *H. Lüers* und *R. Lechner*[4], *K. Myrbäck* und *S. Myrbäck*[5], ferner *W. Syniewski*[6] bestätigten die Feststellung von *J. S. Ford* und *J. M. Guthrie*. Wie schon in unseren früheren Arbeiten hervorgehoben wurde, war diese Anschauung insofern unberechtigt, als nirgends die Abhängigkeit zwischen Abbaugrad des Eiweißes und Anwachsen aktiver Amylasemenge untersucht worden war. Durch unsere Untersuchungen konnten wir zeigen, daß zwischen Eiweißabbaugrad und Zunahme aktiver Amylasemenge eine Abhängigkeit nicht besteht.

In früheren Arbeiten wiesen wir nach, daß unsere Sistosubstanz[7], die eine Eiweißsubstanz ist, unter den drei amylolytischen Funktionen am schwächsten die verzuckernde Funktion inaktiviert. Diese Inaktivierung ist adsorptiver Natur. Durch die Einwirkung des Papains, das angeblich durch Proteolyse die durch Eiweiß (adsorptiv) gebundene Amylase freimachen soll, erfährt fast ausschließlich nur die verzuckernde Funktion eine Vermehrung, während die dextrinierende und verflüssigende Funktion, die einer Adsorption durch unsere Sistosubstanz am leichtesten unterliegen, unter der Einwirkung des Papains fast unverändert bleiben. Wenn es sich bei der Papainwirkung tatsächlich um die Zerstörung einer Eiweißbindung handeln würde, dann müßten vor allem die dextrinierende und verflüssigende Funktion eine Vermehrung erfahren, und gerade dies ist nicht der Fall.

Diese Erwägungen und die Untersuchungsergebnisse sprechen eindeutig gegen die Hypothese, daß die Vermehrung der aktiven Amylase bei der Einwirkung von Papain auf ungekeimtes Getreide durch den

[1] J. Inst. Brewing **14**, 61, 1908. — [2] J. chem. Soc. **121**, 1929, 1922. — [3] Diese Zeitschr. **237**, 20, 1931. — [4] Wochschr. f. Brauerei **50**, 33, 1933. — [5] Diese Zeitschr. **258**, 158, 1933. — [6] Ebenda **158**, 87, 1925. — [7] *T. Chrząszcz*, u. *J. Janicki*, ebenda **260**, 354; **263**, 250; **265**, 260, 1933.

Abbau von die Amylase bindendem Eiweiß bewirkt wird, sondern weisen vielmehr darauf hin, daß es sich hier um ein Freiwerden bzw. eine Mobilisierung von die Amylase aktivierenden Faktoren handeln muß. Es gelang nämlich, durch H_2S die aktive Amylasemenge der Gerste bedeutend kräftiger als durch Anwendung der bisherigen Papainmethode zu vermehren. Trotz dieser kräftigen Vermehrung der aktiven Amylasemenge ist der Eiweißabbau, besonders im Vergleich mit der Papainwirkung, nur unbedeutend, und dieser Umstand ist ein entscheidender Beweis dafür, daß die bisherige Ansicht über die Ursachen der Vermehrung der aktiven Amylase im ungekeimten Getreide nicht richtig war. Interessant ist die Tatsache, daß diese Aktivierung nur bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff eintritt. Nach dessen Entfernung durch Stickstoff geht die Zunahme der amylolytischen Kraft wieder zurück, wobei es gleichgültig ist, ob die Entfernung des Schwefelwasserstoffs vor oder nach dem Abfiltrieren des Gerstenauszuges erfolgt. (Die amylolytische Kraft gleicht dann der ursprünglichen Kraft der ungekeimten Gerste, demnach direkt derjenigen des Wasserauszuges derselben.) Diese Erscheinung ist umkehrbar. Denn wenn man in einen solchen, wieder wenig aktiven Getreideauszug Schwefelwasserstoff einleitet, erlangt dieser Auszug die ursprüngliche hohe Kraft der aktivierten Amylase wieder, um sie wiederum zu verlieren, sobald der Schwefelwasserstoff durch den Stickstoffstrom ausgetrieben wird, was beliebig oft wiederholt werden kann.

Es bleibt hier noch die Frage zu beantworten, ob die Einwirkung des Papains einerseits und des Schwefelwasserstoffs andererseits auf die Aktivierung der Amylase des Gerstenauszuges zwei Prozesse von verschiedener Natur sind, die unabhängig voneinander verlaufen. Wenn dies tatsächlich der Fall wäre, wenn Papain eine Vermehrung der aktiven Amylasemenge durch Abbau des die Amylase bindenden Eiweißes bewirken würde, und wenn der Schwefelwasserstoff eine Mobilisierung von die Amylasewirkung auslösenden Faktoren zur Folge hätte, dann müßte die Summe der Einwirkungen dieser beiden Faktoren eine bedeutend kräftigere Amylaseaktivierung hervorrufen. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, daß dies nicht der Fall ist: Das Zusammenwirken von Papain und H_2S bewirkt nur eine verhältnismäßig geringere Zunahme der Amylaseaktivierung als bei der Einwirkung von H_2S allein. Welcher Art diese Amylaseaktivierung ist und wodurch sie hervorgerufen wird, müssen weitere Versuche zeigen.

Hauptergebnisse.

Untersuchungen über den Einfluß des Schwefelwasserstoffs auf die Amylase des Gerstenauszuges ergaben folgende Resultate:

1. Durch Schwefelwasserstoff kann die aktive Amylasemenge in ungekeimter Gerste bedeutend vermehrt werden, und zwar stets in höherem, mitunter sogar in bedeutend höherem Maße als durch Papain. Die einzelnen Gerstensorten zeigen sowohl hinsichtlich der Amylasemenge als auch der Vermehrung aktiver Amylase große individuelle Unterschiede.

2. Die durch Schwefelwasserstoff hervorgerufene Aktivierung der Getreideamylase verschwindet mit dessen Entfernung durch Stickstoff und kehrt durch erneute Einleitung des Schwefelwasserstoffs in den Getreideauszug zurück, ist demnach eine umkehrbare Erscheinung.

3. Bei der Vermehrung der aktiven Amylase im Gerstenauszug durch Schwefelwasserstoff findet ein nur sehr schwacher Eiweißabbau statt.

4. Die Behauptung, daß die Vermehrung der aktiven Amylasemenge im Getreideauszug durch Abbau des die Amylase bindenden Eiweißes stattfindet, ist nicht richtig. Diese Vermehrung der aktiven Amylase im Getreide erfolgt wahrscheinlich durch Mobilisierung oder Freiwerden von im Getreide sich befindenden Amylaseaktivatoren.

Über arsenhaltige Azoproteine und über die Kuppelungsfähigkeit von Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit Diazobenzolarsinsäure.

Von

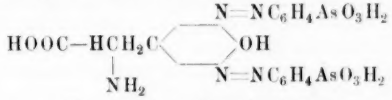
Regine Kapeller-Adler und **Georg Boxer.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 13. Februar 1936.)

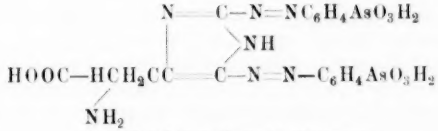
Werden Eiweißkörper mit diazotierter Arsanilsäure umgesetzt, so erhält man ein farbiges Reaktionsprodukt, und zwar ein arsenhaltiges Azoprotein, das nach den grundlegenden Arbeiten von *Landsteiner*[1] die Eigenschaften eines Antigens zeigt. Immunisiert man nämlich Tiere mit diesem Antigen, so werden Antikörper gebildet, welche entsprechend den Untersuchungen *Landsteiners* eine spezifische Affinität zur aromatischen arsenhaltigen Gruppe besitzen.

Die Reaktion der Proteine mit Diazokörpern hat *Pauly*[2] als erster studiert. Auf Grund seiner Versuche behauptet *Pauly*, daß von allen bekannten Aminosäuren nur zwei befähigt seien, bei der Umsetzung mit Diazoverbindungen echte Farbstoffe zu geben, und zwar das Tyrosin und das Histidin. Nur diese Aminosäuren liefern bei alkalischer Reaktion mit Diazolösungen eine intensive Rotfärbung, die anderen hingegen färben sich hierbei reingelb. Dem Autor gelang es auch, die Natur der aus Tyrosin und Histidin entstehenden Azofarbstoffe festzulegen. Bei der Umsetzung von Tyrosin und Histidin mit Diazobenzolarsinsäure erhielt er folgende Verbindungen:



Tyrosin-bis-azobenzolarsinsäure

und



Histidin-bis-azobenzolarsinsäure.

Angeregt durch die Untersuchungen von *Landsteiner*, haben sich zahlreiche Forscher mit der Frage der Umsetzung von Eiweiß mit diazotierter

[1] *Landsteiner*, diese Zeitschr. **86**, 343, 1918; **93**, 106, 1919. Die Spezifität d. serolog. Reaktionen, Berlin, Julius Springer, 1933. — [2] *Pauly*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **94**, 284, 1915.

Arsanilsäure beschäftigt. So kuppelte *Reiner*[1] diazotierte Arsanilsäure mit Antipneumococcensera und *Marrack*[2] mit Pseudoglobulin und mit kristallisiertem Ovalbumin. Das von letzterem Autor dargestellte Azoglobulin enthielt 1,1 bis 2,54 %, das Azoalbumin 1,53 % Arsen. *Haurowitz* und *Breinl*[3] stellten nach der Methode von *Landsteiner* aus Pferdeserum und diazotierter Arsanilsäure Azokörper her, für welche sie, sowie für die Reaktionsprodukte sämtlicher Proteine mit diazotierter Arsanilsäure den Namen Arsanileiweiß vorschlugen. Die von *Haurowitz* und *Breinl* hergestellten Antigene enthielten 1,5 bis 2,1 % Arsen.

Die ersten Forscher, welche der Frage der chemischen Zusammensetzung der Azoproteine nähertraten, waren *Boyd* und *Hooker*[4]. Die Autoren stellten aus Casein, Gelatine und Zein durch Kupplung mit diazotierter Arsanilsäure Azokörper her, untersuchten diese auf ihren Stickstoff- und Arsengehalt und bestimmten das Verhältnis As/N. Allerdings waren die von ihnen verwendeten analytischen Methoden, wie *Boyd* und *Hooker* selbst bemerken, nicht vollkommen zuverlässig. Mittels einer äußerst komplizierten Formel berechneten *Boyd* und *Hooker* die unter der Voraussetzung der Richtigkeit der oben erwähnten *Paulys*chen Annahme zu erwartende Zahl der ins Eiweiß eintretenden Azogruppen. Beim Vergleich dieser errechneten Werte mit den von ihnen analytisch ermittelten Zahlen fanden die Autoren, daß die letzteren bei sämtlichen dargestellten Azoproteinen viel zu hoch waren, so daß sich ihnen der Verdacht ergab, daß entgegen der *Paulys*chen Ansicht außer Tyrosin und Histidin noch andere Aminosäuren der Proteine mit diazotierter Arsanilsäure reagieren würden.

Zur Klarstellung dieser Frage setzten *Boyd* und *Hooker* verschiedene aliphatische und aromatische Aminosäuren mit diazotierter Arsanilsäure in sodaalkalischer Lösung um und verglichen die einzelnen Umsetzungsprodukte nach zweistündiger Reaktionszeit kolorimetrisch mit einer ebenso behandelten Kontrollösung von diazotierter Arsanilsäure. Hierbei fanden sie, daß nur Histidin und Tyrosin eine stärkere Färbung zeigten als die Kontrolle, so daß sie auf Grund dieser Untersuchung sich veranlaßt sahen, die Richtigkeit der *Paulys*chen Hypothese vollkommen zu bestätigen.

In einer späteren Arbeit untersuchten *Boyd* und *Mover*[5] Azoedestin und fanden, daß das Verhältnis As/N beim öfteren Nachdiazotieren des Azoproteins bedeutend steige. Sie erwogen nun die Möglichkeit, ob nicht durch das starke Alkali aliphatische Aminosäuren abgesprengt würden und dadurch das Verhältnis der cyclischen zu den nichtcyclischen Aminosäuren und demzufolge auch der Quotient As/N steigen könnte. Die diesbezüglich durchgeführten Versuche ergaben keine Bestätigung letzterer Annahme.

Auch eine andere von den Autoren vorgeschlagene Hypothese, die im Eiweiß vorhandenen Diketopiperazinringe würden sich mit diazotierter Arsanilsäure umsetzen, erwies sich nicht als stichhaltig. Da die Bildungsmöglichkeit von Diazoaminoverbindungen ebenfalls abgelehnt werden mußte, bedauern *Boyd* und *Mover*, keine befriedigende Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem errechneten und ermittelten Wert für das Verhältnis As/N geben zu können.

---

[1] *Reiner*, Science **72**, 483, 1930; J. Immunology **24**, 213, 1933. — [2] *Marrack*, Brit. J. exper. Path. **12**, 182, 1931. — [3] *Haurowitz* u. *Breinl*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **205**, 259, 1932; **214**, 111, 1933. — [4] *Boyd* u. *Hooker*, J. of biol. Chem. **104**, 329, 1934. — [5] *Boyd* u. *Mover*, ebenda **110**, 457, 1935.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten einige Azoproteine dargestellt und der *Stickstoff- und Arsengehalt* dieser Stoffe exakt bestimmt werden. Haben doch *Boyd* und *Hooker* bei der Analyse dieser Verbindungen keine absoluten Werte, sondern nur die Verhältniszahl As/N angegeben.

Bezüglich der Darstellung der einzelnen Azoproteine hielten wir uns im allgemeinen an die von *Boyd* und *Hooker*[1] gegebene Vorschrift. Wir stellten unter möglichst gleichen Bedingungen das *Azocasein*, *Azofibroin*, *Azozein* und die *Azogelatine* dar. Diese Stoffe stellen durchwegs rotbraun gefärbte Produkte dar, welche in Alkalien mit tiefroter Farbe löslich sind und aus dieser Lösung durch verdünnte Salzsäure in Form von braunen Flocken gefällt werden können. Nach öfterem Umlösen in Lauge und Fällen durch Säure gelingt es, analysenreine Substanzen zu erhalten. In diesen sollte der Stickstoff- und Arsengehalt ermittelt werden.

Die *Stickstoffbestimmung organischer Azoverbindungen* stößt insofern auf Schwierigkeiten, als die üblichen Verfahren der Stickstoffanalyse bei diesen Stoffen versagen. Nun hat *A. Friedrich*[2] im hiesigen Laboratorium das Mikrokjeldahlverfahren durch Vorbehandlung der organischen stickstoffhaltigen Substanz mit kochender Jodwasserstoffsäure derart modifiziert, daß er diese Methode einer generellen Anwendung zugänglich gemacht hat.

Mittels dieses Verfahrens untersuchten wir zunächst das von uns dargestellte Azocasein auf seinen Stickstoffgehalt. Den erhaltenen Wert verglichen wir mit einer an demselben Stoff mittels der Mikrodumasmethode ermittelten Zahl. Der nach der Methode von *Friedrich* bestimmte Wert war viel höher als derjenige nach Dumas. Letztere Methode eignet sich demnach keineswegs zur Stickstoffbestimmung in Azoproteinen, weil offenbar infolge Bildung von stickstoffhaltiger Kohle zu niedrige Stickstoffwerte erhalten werden. *Friedrich* gelang es ferner bei besonders schwer analysierbaren stickstoffhaltigen Stoffen richtige Stickstoffwerte dadurch zu erzielen, daß er die betreffende Substanz im geschlossenen Rohr (Mikrobombenrohr) mit Jodwasserstoffsäure bei rund 200° reduzierte und hierauf gewöhnlich kjeldahlisierte. Vergleichsweise untersuchten wir unser Azocasein auch nach dieser Methode und fanden, daß der erhaltene Stickstoffwert im Vergleich zu dem nach der *Friedrich*schen Mikrokjeldalmethode ohne Bombenrohr ermittelten Stickstoffgehalt erheblich *gestiegen* war. Somit glauben wir annehmen zu können, daß Azoproteine nur richtige Stickstoffwerte mittels des *Friedrich*schen Bestimmungsverfahrens im Bombenrohr liefern. Diese Methode wurde daher bei der Stickstoffanalyse aller von uns dargestellten Azoverbindungen *ausschließlich* verwendet.

Das Arsen bestimmten wir mittels der Methode von *O. Wintersteiner*[3]. Dieses Verfahren beruht darauf, daß Arsen unter Zerstörung der organischen Substanz zur Arsensäure oxydiert wird, welche aus Kaliumjodid Jod frei macht, das mit Thiosulfat titriert werden kann. Bei Gegenwart von Halogenen

[1] *Boyd* u. *Hooker*, J. Immunology **23**, 465, 1932. — [2] *A. Friedrich*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **216**, 68, 1933. — [3] *Wintersteiner*, Mikrochemie **4**, 155, 1926.

in organischen Substanzen sind besondere Vorsichtsmaßregeln notwendig, um richtige Resultate zu bekommen. Die Methode gibt zuverlässige Werte.

Die bei der Untersuchung der von uns dargestellten Azoproteine erhaltenen Zahlen finden sich in der folgenden Tabelle:

Tabelle I.

100 g genuinen Proteins enthalten N in g		100 g Azoprotein enthalten N in g				
Eiweiß	Stickstoff	Azoprotein	Stickstoff		Arsen	
Casein	15,65	Azocasein . . .	15,45 15,10	15,27	8,09 8,19 8,33	8,20
Fibroin	17,8—19,2	Azofibroin . . .	20,82 20,68	20,75	3,62 3,83	3,72
Gelatine . . .	17,97—18,2	Azogelatine . .	18,18 18,17	18,17	14,83 14,84 14,91	14,86
Zein	16,13	Azozein	16,65 16,24	16,44	8,08 8,26	8,17

Beim Betrachten dieser Zahlen ergibt sich folgendes: Der Stickstoffwert der Proteine hat sich nach der Umsetzung mit diazotierter Arsanilsäure außer beim Azofibroin fast überhaupt nicht geändert. Die bei der Analyse der einzelnen Azoproteine erhaltenen Arsenwerte waren folgende: Das Azocasein enthielt rund 8%, das Azofibroin 4%, das Azozein 8% und die Azogelatine 15% Arsen.

Das Azocasein haben wir im übrigen nochmals mit diazotierter Arsanilsäure umgesetzt, um uns davon zu überzeugen, ob vielleicht noch weitere Azobenzolarsinsäurereste ins Molekül eintreten. Das erhaltene Produkt wurde gereinigt und einer Arsenanalyse unterworfen. Da der Arsengehalt gegenüber dem Ausgangsmaterial unverändert geblieben ist, können wir annehmen, daß das Azocasein unter optimalen Bedingungen hergestellt worden ist.

Der bei der Untersuchung der Gelatine erhaltene Arsenwert erscheint uns im Hinblick auf die von *Pauly* aufgestellte Theorie bezüglich der Kupplungsfähigkeit der Aminosäuren besonders auffällig. Da bekanntlich die Gelatine tyrosinfrei ist und nur 0,9% Histidin enthält, war bei der Umsetzung dieses Proteins mit diazotierter Arsanilsäure entweder keinerlei Reaktionsprodukt oder ein solches mit einem sehr niedrigen Arsengehalt zu erwarten, vorausgesetzt, daß die *Paulysche* Annahme zutrifft. Wir erhielten jedoch gerade bei dieser Verbindung den höchsten Arsenwert.

Zum besseren Verständnis bringen wir im Nachstehenden eine Tabelle, in welcher der Anteil der cyclischen Aminosäuren in den von uns zur Umsetzung gebrachten Proteinen festgehalten erscheint. (Die Zahlen entnahmen wir *Otto Kestner*, Chemie der Eiweißkörper, Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn, 1925.)

Tabelle II.

	100 g enthalten in g			
	Casein	Fibroin	Zein	Gelatine
Tyrosin	4,5	11,0	3,6—5,2	0
Histidin	3,4—3,8	0,7	0,8	0,9
Phenylalanin	3,2	1,5	6,6—7,6	1,4
Tryptophan	2,0	0	0	0
Prolin	6,7	1,0	9,0	9,5
Oxyprolin	0,2	0	0	14,1

Betrachtet man diese Tabelle, so fällt bei der *Gelatine* vor allem der sehr hohe Oxyprolin- und der immerhin auch beträchtliche Prolingehalt auf. Tyrosin und Tryptophan fehlen ganz, Histidin und Phenylalanin sind in nur relativ geringer Menge vorhanden.

Das *Casein* enthält bis auf einen geringen Oxyprolinwert die angeführten cyclischen Aminosäuren in nicht unbedeutender Menge.

Das oxyprolin- und tryptophanfreie *Fibroin* zeichnet sich durch einen hohen Tyrosingehalt aus. Das gleichfalls oxyprolin- und tryptophanfreie *Zein* enthält relativ viel Tyrosin, Phenylalanin und Prolin.

Vergleicht man nun die Tabelle II mit den in der Tabelle I festgehaltenen Arsenwerten der einzelnen Azoproteine, so ergibt sich der Verdacht, daß, wie auch schon *Boyd* und Mitarbeiter vermuteten, für die Kupplungsfähigkeit mit diazotierter Arsanilsäure entgegen der *Paulys*chen Annahme nicht allein der Tyrosin- und Histidingehalt eines Proteins von ausschlaggebender Bedeutung sein dürfte, sondern daß beim Zustandekommen dieser Reaktion auch die übrigen cyclischen Aminosäuren eine wesentliche Rolle spielen könnten. Denn nur so wäre es zu erklären, daß beispielsweise die tyrosinfreie und histidinarme, dagegen prolin-, besonders aber oxyprolinreiche Gelatine ein Kupplungsprodukt mit 15% Arsen, das an cyclischer Aminosäure arme Fibroin trotz großen Tyrosingehalts ein solches mit nur rund 4% Arsen liefert, und daß das Zein, das bei gleichem Histidingehalt nur einen Bruchteil des Tyrosinwertes von Fibroin erreicht, ein Reaktionsprodukt mit dem zweifachen Arsenwerte (8%) des Fibroins ergibt. Es enthält aber auch das Zein im Vergleich zum Fibroin ziemlich große Mengen von Phenylalanin und Prolin.

Diese an den Azoproteinen erzielten Ergebnisse waren richtunggebend für die folgenden Untersuchungen, da es unerläßlich schien, die Angaben *Paulys* bezüglich der Reaktionsfähigkeit bzw. Unfähigkeit cyclischer Aminosäuren, mit Diazoverbindungen Kupplungsprodukte zu geben, zu überprüfen. Zu diesem Zwecke brachten wir *Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit diazotierter Arsanilsäure* in Reaktion. Wir hielten uns im wesentlichen an die Angaben von *Pauly*. Hierbei ergab sich nun, daß im Gegensatz zu Histidin und Tyrosin, welche sich, wie schon *Pauly* erwähnt, bei diesem Verfahren intensiv

dunkelrot färben, sämtliche oben angeführten Aminosäuren nur gelbrote Reaktionsflüssigkeiten liefern. Läßt man jedoch diese Lösungen nicht, wie *Pauly* angibt, zwei Stunden, sondern 24 Stunden im Eisschrank stehen, so vertieft sich die Färbung zu einer tiefroten, welche im Falle des Oxyprolins gleich, bei Phenylalanin, Tryptophan und Prolin jedoch schwächer gefärbt erscheint, als diejenige einer alkalischen diazotierten Arsanilsäurelösung (Kontrolle). Wir konnten also bis zu diesem Punkte vollkommen die Angaben von *Boyd* und *Hooker*[1] bestätigen. Fällt man nun diese roten Lösungen mit verdünnter Salzsäure, so gelingt es ohne weiteres, braungefärbte Niederschläge zu erhalten. Nach öfterem Umlösen aus verdünnter Natronlauge und Fällen mit verdünnter Salzsäure ließen sich auf diesem Wege analysenreine Stoffe darstellen.

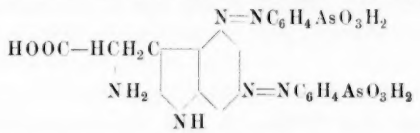
Die bei allen diesen Stoffen durchgeführten Analysen ergaben einwandfrei, daß die neu hergestellten Körper durchwegs *Umsetzungsprodukte zwischen den genannten cyclischen Aminosäuren und diazotierter Arsanilsäure* darstellen. Es reagiert analog dem Tyrosin und Histidin ein Molekül der umgesetzten Aminosäure mit je zwei Molekülen diazotierter Arsanilsäure.

Im folgenden bringen wir die Summen- und Strukturformeln der neu dargestellten Stoffe, wobei wir bei den Konfigurationsbildern hervorheben müssen, daß die Eintrittstellen der Diazoarsanilsäurereste in das Aminosäuremolekül nur in Anlehnung an die entsprechenden *Pauly*schen Formelbilder beim Histidin und Tyrosin gewählt wurden und ebensowenig wie bei *Pauly* durch Konstitutionsermittlung erhärtet worden sind.

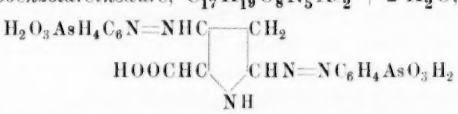
Es wurden dargestellt:

Phenylalanin-bis-azobenzolarsinsäure, $C_{21}H_{21}O_8N_5As_2 + 2\,H_2O$,

Tryptophan-bis-azobenzolarsinsäure, $C_{23}H_{22}O_8N_6As_2$,

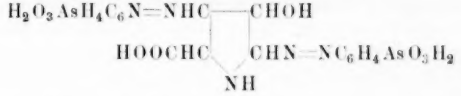


Prolin-bis-azobenzolarsinsäure, $C_{17}H_{19}O_8N_5As_2 + 2\,H_2O$,



[1] *Boyd* u. *Hooker*, J. of biol. Chem. **104**, 329, 1934.

Oxyprolin-bis-azobenzolarsinsäure, $C_{17}H_{19}O_9N_5As_2$.



In diesem Zusammenhange sei übrigens erwähnt, daß schon *Hanke*[1] darauf hingewiesen hat, daß die kolorimetrische Bestimmung des Tyrosins mittels diazotierter Sulfanilsäure durch größere Tryptophanmengen und wahrscheinlich auch andere Eiweißbestandteile gestört werde.

Zusammenfassend kann man auf Grund dieser Ergebnisse folgern, daß in den Proteinen nicht nur Tyrosin und Histidin, sondern auch Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit diazotierter Arsanilsäure reagieren können. Durch diese Annahme erscheinen die hohen Arsenwerte der untersuchten Azoproteine ohne weiteres erklärlich. Die *Paul*ysche Auffassung bezüglich der Kupplungsfähigkeit der Aminosäuren bedarf somit einer wesentlichen Erweiterung.

Versuchsteil und analystische Belege.

I. Allgemeine Darstellung der Azoproteine.

Diese erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von *Boyd* und *Hooker*[2] und beruht darauf, daß das Protein in sodaalkalischer Lösung mit diazotierter Arsanilsäure umgesetzt wird. Nach 24stündigem Aufenthalt im Eisschrank wird die tiefrote Lösung *nicht*, wie *Boyd* und *Hooker* angaben, in Alkohol gegossen und dann erst mit Salzsäure gefällt, sondern direkt mit verdünnter Salzsäure versetzt, der entstandene braunrote Niederschlag abgesaugt und durch wiederholtes Auflösen in verdünnter Lauge und Fällen mit verdünnter Salzsäure gereinigt, hierauf gewaschen, getrocknet und analysiert.

Bereitung der diazotierten Arsanilsäure.

Arsanilsäure wurde aus Atoxyl, dem Natriumsalz dieser Säure, durch Versetzen mit der berechneten Menge verdünnter Salzsäure zunächst in Freiheit gesetzt und hierauf mit verdünnter Salzsäure und unter Eiskühlung tropfenweise mit einer n/2 Natriumnitritlösung bis zur deutlichen Reaktion auf Jodkalistärkepapier versetzt. Das Diazotierungsgemisch wurde $^1/_2$ Stunde im Eisschrank stehengelassen und hierauf unter Eiskühlung mit der alkalischen Lösung des Proteins in Reaktion gebracht.

Methode der Stickstoffbestimmung.

Diese erfolgte nach *A. Friedrich*[3] im *Mikrobombenrohr* durch Vorbehandlung der Substanz mit kochender Jodwasserstoffsäure (p. a., $d = 1{,}7$) und nachfolgender Kjeldahlisierung.

---

[1] *Hanke*, J. of biol. Chem. **79**, 591, 1928. — [2] *Boyd* u. *Hooker*, J. Immunology **23**, 465, 1932. — [3] *A. Friedrich*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **216**, 68, 1933.

Methode der Arsenbestimmung.

Wir verfuhren hierbei nach den Angaben von *O. Wintersteiner*[1]. Dieses Verfahren beruht im wesentlichen auf der oxydativen Veraschung der organischen Substanz, wodurch das Arsen in seine fünfwertige Form übergeht, welche aus Kaliumjodid Jod, das mit n/100 Thiosulfat titriert wird, freimacht. Bezüglich der Einzelheiten der Methodik sei auf das Original verwiesen.

1. Azocasein.

7 g Casein *Hammarsten* wurden in 73 ccm n/10 NaOH gelöst und auf 100 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt, mit 100 ccm n Na_2CO_3-Lösung und hierauf unter Eiskühlung mit einer Lösung von Diazobenzolarsinsäure versetzt. Diese Lösung wurde wie folgt bereitet: 4,9 g Atoxyl wurden mit 47,6 ccm n HCl versetzt. Die entstandene freie Arsanilsäure wurde mit 315 ccm Wasser, welches 2,4 ccm konzentrierte Salzsäure enthielt, versetzt und dieser Lösung wurden unter Eiskühlung etwa 36 ccm n/2 Natriumnitritlösung zugetropft. Die so entstandene Lösung, welche eben eine Reaktion auf Jodkalistärkepapier ergab, wurde für eine halbe Stunde in den Eisschrank gebracht und hierauf mit der oben beschriebenen alkalischen Caseinlösung umgesetzt. Die Ausfällung, Reinigung und Trocknung im Vakuum erfolgte, wie im allgemeinen Teil beschrieben worden ist.

Analysen.

6,399 mg	Substanz:	3,533 ccm	n/50	Säure;	N	15,45 %
5,195 „	„	2,795 „	n/50	„	N	15,10 %
7,908 „	„	1,727 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	8,19 %
9,289 „	„	2,005 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	8,09 %
8,280 „	„	1,840 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	8,33 %

Reaktionsprodukt zwischen Azocasein und Diazobenzolarsinsäure.

a) 2 g Azocasein wurden in 18 ccm n/10 Natronlauge gelöst, auf 30 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit 30 ccm n Na_2CO_3-Lösung versetzt.

b) 1,4 g Atoxyl wurden zunächst mit 13,6 ccm n HCl, hierauf mit 70 ccm Wasser, welche 0,7 ccm konzentrierte Salzsäure enthielten, versetzt und zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 10,2 ccm n/2 Natriumnitritlösung zutropfen gelassen. Beide Lösungen wurden, wie oben beschrieben, miteinander in Reaktion gebracht und verarbeitet.

Arsenanalyse.

8,385 mg	Substanz:	1,773 ccm	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	7,93 %
9,814 „	„	2,080 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	7,94 %
7,426 „	„	1,548 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	7,82 %

2. Azofibroin.

3 g Fibroin wurden mit 120 ccm n NaOH und 50 ccm Wasser versetzt und in der Hitze gelöst. Vom Ungelösten wurde abfiltriert und das Filtrat gekühlt.

[1] *O. Wintersteiner*, Mikrochemie IV, 155, 1926.

1,65 g Atoxyl wurden mit 16 ccm n Salzsäure versetzt. Dann wurden 105 ccm Wasser, welche 0,8 ccm konzentrierte HCl enthielten, hinzugefügt und unter Eiskühlung mit 12 ccm n/2 Natriumnitritlösung versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

Analysen.

5,084 mg	Substanz:	3,782 ccm	n/50	Säure;	N	20,82 %
5,146 „	„	3,802 „	n/50	„	N	20,68 %
6,569 „	„	0,634 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	3,62 %
6,506 „	„	0,664 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	3,83 %

3. Azogelatine.

a) 5 g Gelatine wurden mit 100 ccm n NaOH auf dem Wasserbade erwärmt und die so entstandene gallertige Flüssigkeit wurde unter Eiskühlung mit folgender Diazobenzolarsinsäurelösung versetzt.

b) 4,5 g Atoxyl wurden mit 73 ccm n HCl versetzt und zur Flüssigkeit 32,4 ccm n/2 Natriumnitritlösung allmählich hinzugefügt. Lösung a und b wurden unter Eiskühlung vereinigt und wie gewöhnlich aufgearbeitet.

Die entstandene Azogelatine ist im Gegensatz zu Azocasein und Azofibroin in Wasser leichter löslich, so daß die Ausbeute viel geringer war als bei den erwähnten Stoffen.

Analysen.

5,684 mg	Substanz:	3,692 ccm	n/50	Säure;	N	18,18 %
5,548 „	„	3,603 „	n/50	„	N	18,17 %
6,301 „	„	2,494 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	14,84 %
6,044 „	„	2,392 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	14,83 %
6,269 „	„	2,494 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	As	14,91 %

4. Azozein.

a) 3 g Zein wurden in 60 ccm n NaOH gelöst.

b) 2,7 g Atoxyl wurden mit 42,6 ccm n HCl versetzt und dann allmählich 19,5 ccm n/2 Natriumnitritlösung zutropfen gelassen.

Lösung a und b wurden vereinigt und wie gewöhnlich aufgearbeitet. Azozein ist ebenfalls in Wasser leichter löslich wie das Azocasein und Azofibroin. In 80 %igem Alkohol ist es, wie schon *Boyd* und *Hooker* beobachtet haben, mit orangeroter Farbe löslich.

Analysen.

5,918 mg	Substanz:	3,523 ccm	n/50	Säure;	N	16,65 %
6,018 „	„	3,493 „	n/50	„	N	16,24 %
5,596 „	„	1,206 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	N	8,08 %
6,350 „	„	1,400 „	n/100	$Na_2S_2O_3$;	N	8,26 %

II. Kupplungsprodukte der Diazobenzolarsinsäure mit cyclischen Aminosäuren.

Unter folgenden Bedingungen lassen sich Umsetzungsprodukte von Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit Diazobenzolarsinsäure erzielen. Im wesentlichen hielten wir uns dabei an die *Paulys*che Vorschrift, nur diazotierten wir die Arsanilsäure bei stark saurer Reaktion und ließen die Reaktionslösung nicht 2 Stunden, sondern 24 Stunden stehen. Je ein Millimol Aminosäure wurde nach *Pauly* mit 2 Millimol diazotierter Arsanilsäure in Reaktion gebracht. Zur Herstellung dieser Verbindung wurde zunächst Atoxyl durch die berechnete Menge Salzsäure zerlegt, die Lösung *angesäuert* und dann erst die saure Lösung mit n/5 Natriumnitrit vorsichtig unter Eiskühlung bis zur deutlichen Reaktion auf Jodkalistärkepapier umgesetzt. Nach halbstündigem Stehen im Eisschrank wurde diese Lösung auf die alkalische Lösung der Aminosäure einwirken gelassen. Nach *24stündigem Stehen* im Eisschrank (*Pauly* läßt nur 2 Stunden stehen) vertiefte sich die ursprünglich gelbrote Färbung der Reaktionsflüssigkeit. Diese wurde mit verdünnter Salzsäure gefällt, der Niederschlag abgesaugt, in Lauge gelöst und durch Salzsäure wieder gefällt. Dies wurde mehrmals wiederholt. Der Niederschlag wurde schließlich gründlich gewaschen, im Vakuum getrocknet und analysiert. Es wurden Reaktionsprodukte mit *Phenylalanin*, *Tryptophan*, *Prolin* und *Oxyprolin* erhalten. Die Analysen ergaben, daß in je 1 Mol Aminosäure je 2 Diazobenzolarsinsäurereste eingetreten waren.

1. Phenylalanin-bis-Diazobenzolarsinsäure.

a) 0,66 g Phenylalanin wurden mit 15 ccm n NaOH und 10 ccm gesättigter Natriumacetatlösung versetzt.

b) 2,3 g Atoxyl wurden zur Darstellung freier Arsanilsäure zunächst mit 18 ccm n HCl versetzt. Nach Zusatz von weiteren 12 ccm n HCl wurden unter Eiskühlung etwa 40 ccm n/5 Natriumnitritlösung zutropfen gelassen, bis die Lösung deutlich auf Jodkalistärkepapier reagierte. Nach halbstündigem Stehen wurden die Lösungen a und b vereinigt und nach 24stündigem Stehen im Eisschrank, wie oben beschrieben, aufgearbeitet.

Analysen.

6,122 mg	Substanz;	2,37 ccm	n/50	Säure
6,394 „	„	2,44 „	n/50	„
6,274 „	„	3,77 „	n/100	$Na_2S_2O_3$
6,215 „	„	3,74 „	n/100	$Na_2S_2O_3$

Für $C_{21}H_{21}O_8N_5As_2 + 2\,H_2O$

ber. N = *10,65* %; As = *22,83* %;
gef. N = *10,84* %; *10,69* %. As = *22,53* %; *22,56* %.

2. Tryptophan-bis-Azobenzolarsinsäure.

a) 0,816 g Tryptophan wurden mit 15 ccm n Natronlauge und 10 ccm gesättigter Natriumacetatlösung versetzt.

b) 2,3 g Atoxyl wurden zunächst mit 18 ccm n HCl versetzt. Die so entstandene freie Arsanilsäure mit 12 ccm n HCl angesäuert und unter Kühlung mit 40 ccm n/5 Natriumnitrit tropfenweise versetzt.

Lösung a und b wurden vereinigt und, wie oben beschrieben, verarbeitet.

Im Gegensatz zu Phenylalanin, Prolin und Oxyprolin reagierte Tryptophan rascher mit dem Diazotierungsgemisch, so daß hier bereits nach wenigen Minuten statt der gelbroten eine dunkelrote Färbung entstand.

Analysen.

6,160 mg	Substanz;	2,85 ccm	n/50	Säure
5,862 „	„	2,61 „	n/50	„
5,857 „	„	3,59 „	n/100	$Na_2S_2O_3$
5,741 „	„	3,47 „	n/100	$Na_2S_2O_3$

Für $C_{23}H_{22}O_8N_6As_2$

ber. N = *12,73%*; As = *22,73%*;
gef. N = *12,95%*; *12,47%*. As = *22,95%*; *22,76%*.

3. Prolin-bis-Azobenzolarsinsäure.

a) 0,4 g Prolin wurden mit 35 ccm n Natronlauge versetzt.

b) 1,45 g Atoxyl wurden zunächst mit 14 ccm n HCl versetzt, hierauf wurden 63 ccm Wasser, welche 0,3 ccm konzentrierte HCl enthielten, zugefügt und diese Lösung mit 7,5 ccm n/2 Natriumnitritlösung tropfenweise umgesetzt. Nach Vereinigung beider Lösungen wurde wie immer aufgearbeitet, nur mußte hier die Reaktionsflüssigkeit vor dem Fällen mit verdünnter Salzsäure ein wenig eingeengt werden.

Analysen.

4,765 mg	Substanz;	1,96 ccm	n/50	Säure
5,179 „	„	2,09 „	n/50	„
6,072 „	„	4,01 „	n/100	$Na_2S_2O_3$
5,477 „	„	3,64 „	n/100	$Na_2S_2O_3$

Für $C_{17}H_{19}O_8N_5As_2 + 2\,H_2O$

ber. N = *11,53%*; As = *24,71%*;
gef. N = *11,52%*; *11,30%*. As = *24,73%*; *24,90%*.

4. Oxyprolin-bis-Azobenzolarsinsäure.

a) 1,31 g Oxyprolin wurden mit 20 ccm n NaOH und 10 ccm gesättigter Natriumacetatlösung versetzt.

b) 5,7 g Atoxyl wurden zunächst mit 44 ccm n HCl versetzt. Die freie Arsanilsäure wurde nach Zusatz von 36 ccm n HCl unter Kühlung mit 90 ccm n/5 Natriumnitritlösung vorsichtig in Reaktion gebracht.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie gewöhnlich.

Analysen.

4,916 mg	Substanz;	2,08 ccm	n/50	Säure
4,895 „	„	2,08 „	n/50	„
5,351 „	„	3,66 „	n/100	$Na_2S_2O_3$
5,131 „	„	3,52 „	n/100	$Na_2S_2O_3$
5,378 „	„	3,66 „	n/100	$Na_2S_2O_3$

Für $C_{17}H_{19}O_9N_5As_2$

ber. N = *11,92%*; As = *25,55%*;
gef. N = *11,85%*; *11,90%*. As = *25,63%*; *25,68%*; *25,50%*.

Zusammenfassung.

1. Es wurden Casein, Fibroin, Zein und Gelatine mit Diazobenzolarsinsäure nach der Vorschrift von *Boyd* und *Hooker* unter möglichst gleichen Bedingungen umgesetzt und in den erhaltenen Produkten der Stickstoff- und Arsengehalt bestimmt. Der Stickstoff wurde nach dem von *A. Friedrich* modifizierten Mikrokjeldahlverfahren im Mikrobombenrohr ermittelt. Nur diese Methode liefert zuverlässige Stickstoffwerte bei der Analyse organischer Azoverbindungen. Gewöhnlicher Mikrokjeldahl und Dumas ergaben zu tiefe Resultate.

Die erhaltenen Zahlen finden sich in einer Tabelle zusammengestellt. Der Stickstoffgehalt ist im Verhältnis zum Stickstoffwert der ursprünglichen Proteine wenig verändert. Der Arsengehalt des Azocaseins beträgt rund 8 %, des Azofibroins 4 %, des Azozeins 8 % und derjenige der Azogelatine 14,8 %. Diese Arsenwerte der einzelnen Azoproteine können mit der *Paulys*chen Theorie über die ausschließliche Kupplungsfähigkeit des Tyrosins und Histidins nicht in Einklang gebracht werden.

2. Entgegen der Ansicht *Paulys* gelang es, Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit Diazobenzolarsinsäure in Reaktion zu bringen. Die dargestellten Stoffe wurden analysiert und die erhaltenen Werte stimmten auf die bis-Azobenzolarsinsäurederivate der erwähnten Aminosäuren. Es werden die Darstellungsmethoden, Analysenergebnisse und die Formeln der rein dargestellten Stoffe angeführt.

3. Die hohen Arsenwerte der untersuchten Azoproteine lassen sich dadurch erklären, daß außer Tyrosin und Histidin auch die anderen cyclischen Aminosäuren kupplungsfähig sind.

Das Verhalten der d-Araboascorbinsäure und des Vitamins C gegenüber Ferrosalzen.

Von

Kurt Maurer und **Bruno Schiedt.**

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Jena.)

(Eingegangen am 13. Februar 1936.)

Bekanntlich gibt eine neutrale oder ganz schwach alkalisierte Vitamin C-Lösung mit Ferrosalzen eine tiefblauviolette Färbung[1], die auf eine Komplexbildung schließen läßt. Die isomeren Ascorbinsäuren zeigen die gleiche Reaktion und es ist naheliegend, die Endiolgruppe

für die Erscheinung verantwortlich zu machen. Außer dieser wirkt aber noch der Luftsauerstoff bei der Reaktion mit, wie schon *Szent-Györgyi* beobachtet hat und wie folgender Versuch zeigt: Neutralisiert man eine Isoascorbinsäurelösung mit Soda und verdrängt dadurch den Luftsauerstoff aus der Lösung, dann bleibt nach Zusatz von Ferrosulfat die Lösung zunächst hell. An der Berührungsfläche mit der Luft bildet sich aber nach kurzer Zeit ein violetter Ring, der langsam in die Flüssigkeit eindringt.

Der farbige Komplex läßt sich aus der Lösung leicht gewinnen, wenn man überschüssigen Alkohol, Aceton oder Dioxan zusetzt. Man erhält ein blauschwarzes Pulver, das in Wasser spielend löslich ist und durch erneutes Ausfällen gereinigt werden kann. Um völlig reine Präparate zu erhalten, stellt man isoascorbinsaures Barium her, setzt mit Ferrosulfat um und entfernt das Bariumsulfat. Schließlich erwies sich als beste Methode das Auflösen von Eisenpulver in wässeriger Ascorbinsäure. Hierbei konnte auch ein Einblick in die Rolle des Sauerstoffs gewonnen werden. Arbeitet man unter Luftabschluß, so bleibt die Lösung farblos und es wird iso- bzw. ascorbinsaures Eisen gebildet $(C_6H_7O_6)_2Fe$. Schüttelt man mit Luft, so erscheint sofort die tiefe Farbe und die Lösung nimmt von neuem Eisen auf, bis das Verhältnis Vitamin zu Eisen wie 1 : 1 ist. Der ausgefällte Komplex hat einen Eisengehalt von durchschnittlich 22 %, während die ohne Luft dargestellte Probe 15 % Eisen enthält. Die Ausbeute ist quantitativ.

Das blaue Pulver hat folgende Eigenschaften: Es ist, wie erwähnt, in Wasser sehr leicht löslich. Die Lösung verfärbt sich nach einigen

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **225**, 168, 1934.

Tagen, wird braunstichig und scheidet nach 8 bis 10 Tagen einen kristallisierten gelben Niederschlag ab, der optisch inaktiv ist, in Salzsäure sich löst und nach Zusatz von Natriumacetat wieder ausfällt. Er erwies sich nach Analyse und Kristallform als *Ferrooxalat*. Die gebildete Menge betrug im Mittel 40 bis 50 % derjenigen, die bei der Abspaltung eines Moleküls Oxalsäure aus einem Vitaminmolekül zu erwarten wäre. Es tritt also unter sehr milden Bedingungen ein weitgehender oxydativer Abbau der Ascorbinsäure ein. Daß das Eisen in der zweiwertigen Stufe erhalten bleibt, liegt wohl daran, daß es entweder von überschüssiger Ascorbinsäure oder von stark reduzierenden Abbauprodukten in der niederen Oxydationsstufe gehalten wird, bis es schließlich als schwerlösliches Oxalat der Lösung entzogen wird.

Viel rascher als mit Luft läßt sich die Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd durchführen, die auch bei einem größeren Überschuß dieses Reagenzes mit gleicher Ausbeute wie oben zu *Ferrooxalat* führt.

Die Suche nach anderen Bruchstücken, die bei der Oxydation entstehen müssen, war ergebnislos. Hat man das Ferrooxalat entfernt und die Mutterlauge mit Schwefelwasserstoff von Eisen befreit, so bleibt eine stark reduzierende Lösung, die mit Phenylhydrazin einen amorphen Niederschlag abscheidet, der nicht näher charakterisiert werden konnte. *Ohle*[1] berichtet bei der Oxydation mit Silberoxyd über ähnliche Erfahrungen. Die polarimetrische Untersuchung zeigte Mutarotation an, die stets gleichen Verlauf nahm, im Falle der Isoascorbinsäure aber andere Werte ergab als mit Vitamin C.

Der geschilderte Abbau unterbleibt völlig, wenn man die frisch bereitete blauviolette Lösung unter Luftabschluß aufbewahrt.

Wir untersuchten weiterhin, ob aus dem frisch bereiteten blauen Komplex die Iso-Ascorbinsäure wieder regeneriert werden kann, oder ob bereits bei der Entstehung der Farbe eine tiefgreifende Veränderung des Vitaminmoleküls vor sich geht. Das erste bekannte Oxydationsprodukt des Iso-Vitamins C ist das Diketon, das nach früheren Angaben mit Schwefelwasserstoff quantitativ wieder zum Endiol reduziert wird[2]. Käme das Diketon für die Komplexbildung in Frage, so müßte nach Zerlegung der Eisenverbindung mit Schwefelwasserstoff das Iso-Vitamin wiedergefunden werden. Dies ist nicht der Fall. Durch Jodtitration der von Schwefelwasserstoff befreiten Lösung läßt sich nur eine geringe Menge hochreduzierende Substanz feststellen und die optische Untersuchung zeigt, daß Iso-Ascorbinsäure nicht mehr in nennenswerten Mengen vorhanden sein kann. Die Lösungen, die aus Ascorbin-

[1] Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **67**, 324, 1934. — [2] *K. Maurer* u. *Br. Schiedt*, ebenda **67**, 1239, 1934.

säure und Isoascorbinsäure nach der beschriebenen Art dargestellt waren, ergeben folgende Drehwerte:

$$\text{Ascorbinsäure: } [\alpha]_D = +16{,}00^0 \rightarrow [\alpha]_D = +7{,}95^0;$$
$$\text{Isoascorbinsäure: } [\alpha]_D = +12{,}36^0 \rightarrow [\alpha]_D = -4{,}98^0.$$

Die Komplexbildung ist demnach von einer tiefgreifenden Veränderung des Vitaminmoleküls begleitet und führt zu Produkten, die mit Schwefelwasserstoff nicht mehr zum Vitamin reduziert werden. Über die Art der neu entstandenen Produkte läßt sich nicht viel aussagen, denn es gelang auch bei diesen Versuchen nicht, irgendwelche Abwandlungsprodukte zu isolieren.

Auch biologische Versuche sprechen dafür, daß in den blauen Lösungen kein Vitamin C mehr vorhanden ist. Die Eisenlösungen werden bei intravenöser Injektion gut vertragen, worauf schon *Szent-Györgyi* hinweist, und bewährten sich bei der Behandlung sekundärer Anämien bei einer großen Zahl von Patienten sehr gut, worüber an anderer Stelle ausführlich berichtet wird. Ein Unterschied bei Anwendung von Ascorbinsäure oder Isoascorbinsäure war niemals zu bemerken.

Die Komplexbildung der Ascorbinsäuren ist naturgemäß nicht nur auf das Eisen beschränkt, sondern mit vielen anderen Metallen möglich. Der Unterschied von Ascorbinsäure und Isoascorbinsäure gegenüber Uranylacetat wurde bereits beschrieben[1].

Beschreibung der Versuche.

Demonstrationsversuch zum Nachweis der Luftempfindlichkeit.

Man vermischt eine etwa 5%ige wässerige Lösung von Isoascorbinsäure mit verdünnter Ferrosulfatlösung und setzt eine geringe Menge festes Bicarbonat zu. Nach Aufhören der CO_2-Entwicklung bildet sich bei ruhigem Stehen an der Oberfläche der Lösung ein blauvioletter Ring, der langsam in die Flüssigkeit hineindiffundiert.

Darstellung des blauen Komplexsalzes.

1. 1,76 g Isoascorbinsäure[2] werden mit 2,78 g Ferrosulfat in 25 ccm Wasser gelöst und mit 3,15 g fein gepulvertem Bariumhydroxyd [oder 0,74 g $Ca(OH)_2$] bei Luftzutritt geschüttelt, bis sich ausgeschiedenes Ferrohydroxyd wieder gelöst hat und die blauviolette Lösung kein Sulfat mehr enthält. Das vom Barium- bzw. Calciumsulfat befreite Filtrat wird in 200 ccm Aceton eingegossen und der sich abscheidende Niederschlag nach kurzem Stehen abgesaugt. Nach dem Trocknen im

[1] *Bachstuz* u. *Cavallini*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **228**, 25, 1934. — [2] Darstellung siehe *K. Maurer* u. *Br. Schiedt*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **66**, 1054, 1933; **67**, 1239, 1934.

Vakuum resultiert ein amorphes blauschwarzes Pulver, das sich in Wasser leicht mit blauvioletter Farbe löst. Ausbeute: 1,8 g.

2. 1,76 g Isoascorbinsäure werden mit 2,78 g Ferrosulfat in 15 ccm Wasser gelöst und mit 7,3 g Diäthylamin (oder äquivalenten Mengen von Methylamin, Pyridin) versetzt. Die Lösung wird mit Luft geschüttelt bis sie eine rein blauviolette Farbe angenommen hat und dann in 200 ccm Alkohol eingegossen. Zur Entfernung restlichen Diäthylamins wird die Fällung mit warmem Alkohol gewaschen und das blaue Pulver im Vakuum getrocknet.

3. 1,76 g Isoascorbinsäure werden in 15 ccm Wasser gelöst und mit 0,56 g Ferrum reductum auf dem Wasserbad erwärmt; wenn die Wasserstoffentwicklung nachgelassen hat, wird das Gemisch bei Luftzutritt solange geschüttelt, bis es eine tiefblauviolette Farbe angenommen hat und das Eisen bis auf wenige Reste in Lösung gegangen ist. Die filtrierte Lösung wird nun in 150 ccm Aceton eingegossen, der Niederschlag abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,3 g = 100 %.

Kontrollversuch unter Luftabschluß.

1,76 g Isoascorbinsäure oder Ascorbinsäure werden in 30 ccm luftfreiem Wasser gelöst, 0,56 g Ferrum reductum zugegeben und mit Toluol überschichtet. Zunächst wird auf dem Wasserbad erwärmt, bis die Wasserstoffentwicklung nur noch gering ist und dann 48 Stunden gut verschlossen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die wässerige Schicht war dann nur schwach gefärbt; die Menge des nicht in Lösung gegangenen Eisens betrug 0,26 g. Es war demnach $^1/_2$ Atom Eisen in Lösung gegangen unter Bildung von Eisenascorbinat. Beim Schütteln der von Toluol befreiten Lösung mit der vorher abfiltrierten Eisenmenge unter Luftzutritt war nach 4 Stunden Lösung erfolgt unter Bildung des tief gefärbten Komplexsalzes.

Analytische Untersuchungen des Komplexes.

Von den zahlreich ausgeführten Eisenbestimmungen sind folgende drei herausgegriffen worden.

0,3458 g	Subst.:	0,1214 g Fe_2O_3	Gef.	24,50 % Fe.
0,2320 g	„	0,0670 g Fe_2O_3	„	20,20 % Fe.
0,2320 g	„	0,0678 g Fe_2O_3	„	20,46 % Fe.

Das blaue Pulver ist in trockenem Zustand an der Luft viele Tage beständig und nimmt erst bei längerem Liegen eine bräunliche Nuance an. Gegen Alkalien ist die Substanz recht empfindlich, mit Natronlauge fällt Eisenhydroxyd aus. Säuert man an, so verschwindet die Farbe, nur in schwach saurem Gebiet (bis p_H 2) bleibt die Farbe bestehen.

Die optische Untersuchung der mit Säure entfärbten Lösung lieferte folgende Werte:

0,1928 g des Komplexes aus Isoascorbinsäure zu 10 ccm 10 %iger HCl gelöst: $[\alpha_D] = +20{,}0^0$, nach 48 Stunden $[\alpha_D] = -8{,}56^0$.

0,2026 g des Komplexes aus Ascorbinsäure zu 10 ccm 10 %iger HCl gelöst: $[\alpha]_D = +16{,}3^0$, nach 48 Stunden $[\alpha]_D = +5{,}18^0$ konstant.

Die reinen Säuren zeigen unter den gleichen Bedingungen keine Drehungsänderung.

Die Zerlegung des Komplexes mit Schwefelwasserstoff:

0,3230 g Substanz wurden zu 20 ccm Wasser gelöst, mit H_2S gesättigt, vom Niederschlag abfiltriert und das Filtrat polarisiert. Isoascorbinsäurekomplex: $[\alpha]_D = +12{,}36^0$, nach 48 Stunden $[\alpha]_D = +4{,}98^0$. Ascorbinsäurekomplex: $[\alpha]_D = +16{,}00^0$, nach 48 Stunden $[\alpha]_D = +7{,}95^0$. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die mit H_2S gesättigte Lösung schwach ammoniakalisch gemacht, nach kurzem Stehen vom Niederschlag abfiltriert und das mit Essigsäure angesäuerte und mit Kohlensäure vom Schwefelwasserstoff befreite Filtrat mit n/10 Jod titriert. Die verbrauchte Jodmenge entsprach etwa 50 % der aus der Einwaage berechneten Ascorbinsäure bzw. Isoascorbinsäure.

Eine nach dieser Vorschrift dargestellte und mit Eisessig angesäuerte Lösung wurde mit Phenylhydrazin versetzt. Nach kurzer Zeit schied sich ein amorpher gelbbrauner Niederschlag ab, der nicht zur Kristallisation zu bringen war.

Oxydation des Komplexsalzes mit Wasserstoffperoxyd.

2 g isoascorbinsaures Natrium werden mit 2,78 g Ferrosulfat in 50 ccm Wasser gelöst und langsam mit 5 ccm Perhydrol versetzt. Unter heftiger Erwärmung färbt sich die Lösung rotbraun und nach wenigen Minuten beginnt die Abscheidung eines gelben Salzes. Nach Stehen über Nacht wird abgesaugt und mit Wasser und Alkohol gewaschen. Ausbeute: 0,8 g. Zur Reinigung wird in 10 ccm verdünnter Salzsäure gelöst und mit gesättigter Natriumacetatlösung versetzt. Nach wenigen Stunden ist das *Ferro-oxalat* vollständig auskristallisiert.

5,500 mg; 5,420 mg Subst.: 1,210, 1,160 mg H_2O; 2,760, 2,705 mg CO_2; 2,420, 2,40 mg Fe_2O_3.

$C_2O_4Fe + 2\,H_2O$ (180)	Ber.:	C 13,33 %,	H 2,22 %,	Fe 31,11 %
	Gef.:	13,69 %,	2,46 %,	30,77 %
		13,61 %,	2,40 %,	30,97 %

Die Mutterlauge vom Ferrooxalat wird nach Neutralisieren mit Ammoniak mit Schwefelwasserstoff vom Eisen befreit und nach Ansäuern eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst und mit Phenylhydrazin und Essigsäure versetzt. Es entsteht ein gelbroter amorpher Niederschlag, der nicht zur Kristallisation zu bringen war.

Über den Einfluß einiger Fettsäuren auf die Blutglykolyse.

Von

G. D'Alessandro und **S. Petrucci.**

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Palermo.)

(Eingegangen am 13. Februar 1936.)

Die Untersuchungen unserer Schule (1) über den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel von Trägern maligner Tumoren haben zwei Tatsachen ergeben:

1. Aus den Tumoren selbst, aus den Organen und aus dem Serum von Trägern maligner Tumoren lassen sich nach Antrocknung des Materials an Filtrierpapier mit Äther in der Kälte ungesättigte Verbindungen in größerer Menge extrahieren als aus normalem Material. Mit besonderer Deutlichkeit ist die Erhöhung der ungesättigten Fettsäuren an den Lebern von Ratten mit *Jensen*-Sarkom nachzuweisen (2).

Dieser erhöhten Disponibilität ungesättigter Valenzen entspricht auch eine erhöhte immunologische Disponibilität. Denn, zum Unterschied von normalen Geweben und Organen der Ratte, lassen sich aus dem getrockneten *Jensen*-Sarkom durch einfache Behandlung mit Äther in der Kälte die artspezifischen Antigenstrukturen gewinnen, wie man mit Hilfe der klassischen immunologischen Methoden nachweisen kann (3). Diese Tatsachen stellen also eine direkte Bestätigung der Hypothese von *Rondoni* (4) dar, der annahm, daß die Ursache der serologischen Disponibilität von Tumorlipoiden in einer verminderten Festigkeit der *Bindung zwischen Lipoid und Tumorgewebe* gelegen ist.

2. Die Blutkörperchen von tumorkranken Menschen zeigen eine etwa zweimal stärkere Glykolyse als die von gesunden Vergleichspersonen. Diese beiden zunächst nebeneinander bestehenden Grundtatsachen führten zur Frage, ob hier ein Abhängigkeitsverhältnis besteht. Aus einer an unserem Institut durchgeführten Untersuchung von *Fabisch* (im Druck) ergibt sich, daß methylalkoholische Auszüge aus Tumoren sowie aus Blut (Serum und Blutkörperchen) und Organen von Trägern maligner Tumoren das glykolytische Vermögen von normalen Blutkörperchen bedeutend stärker zu erhöhen imstande sind als entsprechende Extrakte aus Blut und Organen von gesunden Menschen und Tieren (Ratten).

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es, den Einfluß einiger gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf die Blutkörperchenglykolyse zu untersuchen. Besondere Veranlassung zur Beschäftigung mit diesen Fragestellungen waren außer dem hohen biologischen Interesse, das Substanzen dieses Typus bieten, die vielfachen Beziehungen, die zwischen dem Studium der Fettsäuren und der gesamten Forschungs-

richtung unserer Schule bestehen. Denn die besondere Aufmerksamkeit auf dem Gebiete der Tumorforschung wandte sich Verbindungen dieser Art in dem Augenblick zu, als nachgewiesen werden konnte, daß bei der Meiostagminreaktion (5) die methylalkoholischen Tumorextrakte durch einige isolierte Fettsäuren, wie Rizinol- und Linolsäure, ersetzt werden können (*Izar*).

Es sei hier daran erinnert, daß sich bereits *Kisch* (6) mit der Wirkung einiger Fettsäuren mit niedriger C-Atomzahl auf die Gewebsatmung beschäftigt hat und im allgemeinen, wenn man von einer später zu erwähnenden Ausnahme absehen will, eine geringe Förderung der Atmung feststellen konnte.

Technik.

Wir verwendeten als glykolytisches System Citratblutkörperchen von normalen Menschen. Das Blut wurde nüchtern entnommen und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung auf der Zentrifuge gewaschen. Zu 0,5 ccm des gewaschenen Blutkörperchenbreies gaben wir 3 ccm einer 2‰ Glucose enthaltenden Ringerlösung, zu der die zu untersuchenden Fettsäuren zugesetzt worden waren. Die Ansätze wurden sodann 3 Stunden bei 37° im Brutschrank gehalten und danach zentrifugiert. Von der über den Blutkörperchen stehenden Flüssigkeit entnahmen wir 2 ccm und bestimmten in diesen die Milchsäure nach *Fürth-Charnass*. Die in den Tabellen mitgeteilten Zahlenwerte beziehen sich immer ohne weitere Umrechnung auf diese 2 ccm. Die Fehlergrenze der Methode liegt für Zahlen von der Größenordnung der in unseren Versuchen erhaltenen bei 1 bis 2%.

Die angewandten Fettsäuresuspensionen stellten wir in folgender Weise her: 0,1 ccm der zu untersuchenden Säure werden mit einer Pipette exakt abgemessen und zu 10 ccm der 2‰ Glucose enthaltenden Ringerlösung zugegeben. Dann wird etwa 1 Minute lang kräftig geschüttelt, um die Substanz, so weit das überhaupt erreichbar ist, gleichmäßig in der wässerigen Lösung zu verteilen. Die so hergestellten Suspensionen haben eine sehr geringe Stabilität. Um die Fehlermöglichkeiten, die durch die Verschiedenheit der einzelnen Emulsionen bedingt sind, nach Möglichkeit zu vermindern, haben wir in allen Versuchen die Emulsionen sofort oder höchstens wenige Minuten nach ihrer Herstellung verwandt. Die in den Versuchen benutzten Mengen lagen zwischen 0,01 und 0,3 ccm.

Geprüft wurden: zwei verschiedene Rizinolsäurepräparate (*E. Merck* und *Polak & Schwarz*), Ölsäure von *Carlo Erba* und Pelargonsäure von *Schuchardt*, die sich alle in einigermaßen vergleichbarer Weise emulgieren ließen.

Bei den von uns verwendeten Säuremengen sahen wir nie Hämolyse stärkeren Grades auftreten.

Was die geringe Stabilität der Emulsionen anlangt, so ist zu sagen, daß eine gewisse Bedeutung zweifellos der Tatsache zukommt, daß die emulgierten Fettsäuren mit den Aufschwemmungen von Blutkörperchen in Kontakt gebracht wurden. Mit größter Wahrscheinlichkeit werden die Säuren von den Blutkörperchen adsorbiert, wie man aus der Klarheit und Durchsichtigkeit der Ringerlösung nach dem Abzentrifugieren der Blutkörperchen am Ende der Versuche entnehmen kann. Aus diesem Grunde vermindern sich wahrscheinlich die Fehlermöglichkeiten, die von der unterschiedlichen Qualität und Stabilität der Emulsionen abhängen.

Der größte Teil der Versuche wurde mit den Rizinolsäuren durchgeführt. Wir haben uns in zahlreichen Vorproben davon überzeugt, daß der Rizinolsäurezusatz die Exaktheit der Milchsäurebestimmungen nicht beeinflußt.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Zugesetzte Rizinolsäure in mg: 0	0,094	0,188	0,282	0,367	0,470	0,940	1,88	3,76
	Gefundene Milchsäure in mg								
1	0,153	0,184				0,227	0,210	0,189	
2*	0,232	0,229	0,270	0,459		0,225		0,270	
3	0,168	0,178	0,232	0,220		0,234	0,270	0,324	
4	0,158	0,166	0,156	0,255	0,232	0,298	0,248	0,170	0,160
5	0,166	0,171		0,163		0,201	0,297	0,211	0,173
6	0,153	0,159	0,171	0,208		0,230	0,228	0,190	0,141
7	0,152	0,134	0,165	0,217		0,208	0,201	0,209	0,141

* Blutkörperchen eines Tumorkranken.

Wie die Zahlen der Tabelle I zeigen, erhöht der Zusatz der Rizinolsäure zu den Blutkörperchenaufschwemmungen die Menge der fermentativ gebildeten Milchsäure. Doch ist die Größe der Milchsäurevermehrung von Fall zu Fall verschieden und schwankt von einem Minimum von etwa 50 % bis zu etwa 100 % als Maximum. Die Tabelle I läßt weiter erkennen, daß eine optimale Rizinolsäurekonzentration für die Glykolyseerhöhung existiert. Die optimale Rizinolsäuremenge ist nicht in allen Fällen gleich, liegt aber meistens zwischen 0,282 und 0,9 mg Säure.

Wenn wir auch einerseits eine Glykolysevermehrung durch Rizinolsäure in allen untersuchten Fällen feststellen konnten, so fanden wir doch starke Unterschiede zwischen den einzelnen Blutproben bezüglich des ‚Grades der Glykolysesteigerung, vor allem, wenn man das Verhältnis zwischen Zunahme der Milchsäurebildung und Konzentration der Rizinolsäure berücksichtigt.

Wir haben daran gedacht, daß vielleicht die Ergebnisse durch eine Änderung des p_H, die durch die Anwesenheit der Rizinolsäure in dem glykolytischen System verursacht wäre, vorgetäuscht sein könnten. Die hierauf gerichteten Untersuchungen hatten jedoch ein negatives Ergebnis; es ergab sich, daß der Zusatz von Rizinolsäure zur Ringerlösung deren p_H nicht verschiebt.

Wir gingen dann dazu über, in entsprechender Weise andere Säuren zu untersuchen. Da sich von Stearin- und Palmitinsäure, deren Molekulargewichte nahe bei dem der Rizinolsäure liegen, einigermaßen brauchbare Aufschwemmungen auf unsere Weise nicht herstellen ließ, verwandten wir Ölsäure und die (gesättigte) Pelargonsäure.

Die Ergebnisse (Tabelle II) entsprachen vollkommen denen, die wir bei Verwendung von Rizinolsäure erhalten hatten.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Zugegebene Ölsäure in mg: 0	0,089	0,179	0,269	0,449	0,898	1,79	2,69
	Gefundene Milchsäure in mg							
1	0,168	0,173		0,216	0,293	0,205	0,218	0,232
2	0,111	0,120		0,155	0,183	0,187	0,174	0,168

Versuch Nr.	Zugegebene Pelargonsäure in mg: 0	0,097	0,181	0,278	0,455	0,907	1,81	2,72
	Gefundene Milchsäure in mg							
3	0,150	0,165		0,186	0,232	0,204	0,190	0,131
4	0,133	0,120	0,125	0,158	0,240	0,215	0,186	0,151

Man erkennt aus der Zusammenstellung, daß auch diese beiden Säuren einen deutlichen Einfluß auf die Glykolyse der Blutkörperchen ausüben. Die Versuche waren regelmäßig reproduzierbar und zeigten die schon erwähnte charakteristische Form der Abhängigkeit der Glykolysesteigerung von der Konzentration der Säuren, die bei den verschiedenen Proben wenn auch nicht zu identischen, so doch zu analogen Ergebnissen führten.

Einen Unterschied in der Wirkung auf die Glykolyse, je nachdem, ob eine gesättigte oder eine ungesättigte Fettsäure verwendet wurde, konnten wir bei der Untersuchung entgegen unseren Erwartungen nicht finden. Vielmehr sind zu einer Aktivierung der Blutkörperchenglykolyse die geprüften gesättigten *und* ungesättigten Fettsäuren von hohem Molekulargewicht fähig. Jedenfalls aber erlauben uns die hier mitgeteilten Befunde auf eine besondere Bedeutung der höheren Fettsäuren für die Atmung und Glykolyse zu schließen.

Zusammenfassung.

Der Zusatz von Rizinol- und Ölsäure, also zwei hohen ungesättigten Fettsäuren, und Pelargonsäure, einer gesättigten Fettsäure, zu gewaschenen Blutkörperchen erhöht deren Glykolysevermögen bedeutend. Die Größe der Glykolysesteigerung ist verschieden je nach der Konzentration der zugegebenen Säuren und zeigt außerdem für die Blutkörperchen verschiedener Personen individuell wechselnde Werte.

Literatur.

1) *M. Ascoli*, Klin. Wochenschr. 1935, S. 1593 (Literatur). — 2) *R. Indovina* u. *F. Gurcio*, im Druck in Biochimica e Terapia Sperimentale. — 3) *G. D'Alessandro* u. *L. Gaglio*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **87**, 137, (1936). 4) *P. Rondoni*, Minerva Medica, anno XII, Vol. 9, 1931; Acta. Cancer. H. 5, Bd. 1. — 5) *M. Ascoli*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilkde. 1924, S. 945. — 6) *B. Kisch*, diese Zeitschr. **253**, 347, 1932.

Über die Mikrobestimmung des Kupfers mit Hilfe der lichtelektrischen Photometrie.

Von

B. Eisler, K. G. Rosdahl und **H. Theorell.**

(Aus der Chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts Stockholm.)

(Eingegangen am 17. Februar 1936.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Anschluß an Untersuchungen über die Hämatopoese[1] war es notwendig, über eine exakte Bestimmungsmethode des Kupfers zu verfügen. Die bereits vorhandenen Methoden erlauben eine Bestimmung nur in relativ großen Mengen und ihre Genauigkeit für die Messung ganz geringer Ausschläge ist unzureichend. Auch das stetig steigende Interesse, das man dem Kupfer als Katalysator entgegenbringt, ließ es uns nützlich erscheinen, ein genaues Verfahren zur Bestimmung kleinster Mengen zu haben bzw. auszuarbeiten. Die im folgenden mitgeteilte Methode ermöglicht es, mit größter Genauigkeit geringste Cu-Mengen in Gegenwart anderer Schwermetalle, wie z. B. Eisen, zu bestimmen und Serienanalysen auch bei kleinen Versuchstieren durchzuführen.

Für unsere Zwecke hat sich die Dithiodiäthylcarbamatmethode[2] als die am besten geeignete erwiesen. Bei diesem Verfahren erhält man in der Konzentration, wie sie bei Analysen biologischen Materials entsteht, eine gelbliche Lösung. Geringe Konzentrationsänderungen können in entsprechender Genauigkeit weder durch Kolorimetrie noch mit dem Stufenphotometer gemessen werden, da, wie Abb. 1 zeigt, das Absorptionsmaximum des Farbstoffes in einem Spektralbereich liegt, wo das menschliche Auge Intensitätsdifferenzen nur schwach wahrzunehmen vermag, nämlich bei 435 bis 440 mμ. Zur exakten Messung blieb nur die Möglichkeit offen, den Farbstoff mit Hilfe der lichtelektrischen Photometrie zu messen, wir verwandten für unsere Untersuchungen die Anordnung, wie von *Warburg* und *Negelein* angegeben[3].

Der Analysengang wurde von uns in mannigfacher Weise gegenüber dem aus der Literatur bekannten abgeändert; so war es uns möglich, die gesamte Analyse vom Abwägen des Organstückes bis zur Überführung des Amylalkohols in die Meßküvette in demselben halbgeschlossenen Pyrexrohr durchzuführen.

---

[1] Naturwiss. 1936, H. 9, S. 142. — [2] *Callan* u. *Henderson*, Analyst. **54**, 650, 1929; *McFarlane*, Biochem. J. **26**, 1022, 1932; *S. L. Thompsett*, ebenda **28**, II, 1544, 1934. — [3] *O. Warburg* u. *E. Negelein*, diese Zeitschr. **214**, 82, 1929.

Methodik.

Organe oder Blut werden in einem 25 ccm Pyrexrohr mit eingeschliffenem Stopfen abgewogen, getrocknet (Hochvakuum) und unter Zusatz von H_2SO_4 und $HClO_4$ im Sandbad erhitzt, bis das Reaktionsgemisch farblos oder schwach gelb ist. Die Flüssigkeit wird nach dem Erkalten unter Wasserkühlung mit 8 bis 9 %iger NH_3-Lösung gegen Lackmus schwach alkalisch gemacht. Zum Ausfällen des Eisens wird die alkalische Lösung mit 5 ccm 4 %iger Na-pyrophosphatlösung versetzt, nachher 30 Minuten auf 80° C erhitzt; abkühlen bis Zimmertemperatur, dann Zusatz von 2 ccm Wasser und 5 ccm Amylalkohol, hierauf unmittelbar 0,5 ccm einer 2 %igen Lösung von dithiodiäthylcarbaminsaurem Na. Sind vor dem Wasserzusatz (2 ccm) kristallinische Niederschläge vorhanden, so müssen diese vorerst durch Wasser gelöst werden. Die Lösung wird nunmehr kräftig geschüttelt und klarzentrifugiert. Die amylalkoholische Lösung wird in eine Meßküvette pipettiert und die Lichtabsorption bei 440 mμ gemessen. Eine Blindprobe mit und ohne Zusatz von Cu wird in gleicher Weise behandelt und die Messungen erfolgen stets mit der Blindprobe alsVergleich. Zur Analyse benutzten wir: Chemikalien von *Schering-Kahlbaum* pro analysi und durch Destillation kupferfrei gemachtes Wasser.

Unsere Erfahrungen mit der Methode zeigten ferner, daß die Farbstärke der amylalkoholischen Lösung abhängig ist von der Menge der zum Aufschließen benutzten Schwefelsäure, oder mit anderen Worten: von der Salzkonzentration der wässerigen Phase. Den Einfluß der Salzkonzentration zeigt folgendes Versuchsergebnis: mit 0,5 ccm H_2SO_4 zur Verbrennung erhielten wir $\beta_{440} = 2{,}74 \cdot 10^7$; mit 1,0 ccm H_2SO_4 $\beta_{440} = 2{,}91 \cdot 10^7$.

Beleganalysen.

Abb. 1 zeigt die Absorptionskoeffizienten ($\beta = 1/c \cdot 1/d \cdot \ln J_0/J$, wo c = g Atome/ccm und d = Schichtdicke in cm) der gefärbten Cu-Komplexverbindung.

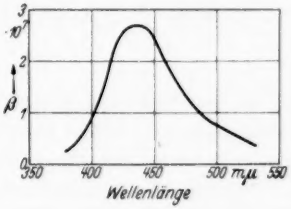


Abb. 1.

Tabelle I.

γ Cu in 5,5 ccm Amylalkohol	J_0/J	$c\left[\frac{\text{Mole}}{\text{ccm}}\right]$	$\beta = (1/c \cdot 1/d \cdot \ln J_0/J) \cdot 10^{-7}$
0,5	1,099	$0{,}143 \cdot 10^{-8}$	2,64
1,0	1,221	$0{,}286 \cdot 10^{-8}$	2,71
2,5	1,636	$0{,}715 \cdot 10^{-8}$	2,73
5,0	2,620	$1{,}42 \cdot 10^{-8}$	2,68
10,0	7,050	$2{,}86 \cdot 10^{-8}$	2,71
			Mittelwert = 2,694

$d = 2.51$ cm, $\lambda = 440$ mμ. 0,5 ccm H_2SO_4 zur „Verbrennung".

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode der Cu-Bestimmung beschrieben, die es unter Zuhilfenahme der lichtelektrischen Photometrie erlaubt, Cu-Mengen von 0,5 γ an im biologischen Material in Gegenwart von Fe in exakter Weise zu bestimmen.

Zur Frage des Säurecharakters der Cellulose; zugleich eine Mitteilung über Oxydationsvorgänge an Membranstoffen.

Von

Max Lüdtke.

(Eingegangen am 18. Februar 1936.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die pflanzliche Zellmembran und der daraus isolierte Zellstoff zeigen infolge Anwesenheit hochmolekularer Säuren organischer Natur sauren Charakter, der normalerweise natürlich durch Kationen verdeckt ist. Frühere Veröffentlichungen[1] brachten Angaben über die Bestimmung dieser Säuren und über ihre Menge in verschiedenem Zellwandmaterial. Es fehlte noch eine Untersuchung über den Einfluß, den chemische und biologische Vorgänge auf den Säuregehalt ausüben, und damit eine Prüfung des primären Vorhandenseins oder sekundären Entstehens der Säuregruppen, um an Hand der Ergebnisse die Brauchbarkeit der Säurezahl[2] zur Einsichtnahme in bestimmte Vorgänge oder zur Klärung von Konstitutionsfragen an einzelnen Wandstoffen beurteilen zu können. Die nachfolgenden Ausführungen sollen diese Lücke schließen.

Versuche.

1. Die Frage nach der Zugehörigkeit von Carboxylgruppen zum Cellulosemolekül wäre leicht zu lösen, wenn Materialien vorhanden

[1] *M. Lüdtke*, diese Zeitschr. **268**, 372, 1934; Technologie und Chemie der Papier- und Zellstoff-Fabrikation **31**, 37, 1934; Papier-Fabrikant **32**, 509, 528, 1934; Angew. Chem. **48**, 650, 1935. — [2] Als Säurezahl wird die in 1 g trockener Substanz befindliche Säuremenge bezeichnet, ausgedrückt in Kubikzentimetern einer gedachten n/100 Lösung. Unseren früheren Angaben betr. Herstellung der Calciumacetatlösung sei hinzugefügt, daß wir ein Calciumacetat siccum von *Merck* verwenden, von dem 79 g im Liter kohlensäurefreien Wassers gelöst werden. Die Lösung bleibt zunächst einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wird über Nacht im Eisschrank (+ 6°) aufbewahrt, wobei die Verunreinigungen zu Boden fallen. Die überstehende klare Flüssigkeit wird zum Gebrauch abpipettiert und weist jetzt gegen Phenolphthalein (1 Tropfen auf 5 ccm) fast neutrale Reaktion auf. Gewöhnlich sind auf 50 ccm Lösung 0,10 bis 0,20 ccm n/100 Natronlauge nötig, um den Umschlag, der beim Auftreten eines ganz schwach roten Scheines festgestellt wird, zu erhalten. Der Säuregrad der Calciumlösung geht im Verlauf von etwa 14 Tagen bis zu einem Verbrauch von 0,70 ccm n/100 Lauge für 50 ccm herauf. Ältere Lösungen pflegen wir nicht mehr zu verwenden. Der festgestellte Laugenverbrauch des Blindversuchs wird, wie früher beschrieben, in Rechnung gesetzt. Die Titration erfolgt bei Tageslicht.

wären, die reine, frei von Begleitstoffen gewachsene Cellulose darstellten. Stoffe dieser Art sind aber nicht bekannt. Deshalb wurde nach Ausgangsprodukten gesucht, in denen die Begleitsubstanzen mengenmäßig gering und durch chemische Indifferenz ausgezeichnet waren. Auch solch ein Material ließ sich nicht finden. Wie Tabelle I zeigt, weisen die cellulosehaltigen Rohstoffe stets höhere Säurezahlen auf, als der daraus gewonnene Zellstoff. Rohe Baumwolle, die auf den ersten Blick besonders geeignet erscheinen mag, macht hiervon keine Ausnahme. Immerhin ist sie durch ihren ‚hohen' Cellulosegehalt für die Untersuchung besonders brauchbar, weshalb sie zunächst betrachtet sei.

Tabelle I. Säurezahlen von cellulosehaltigem Material in n Calciumacetatlösung.

	Einwaage trocken	Säurezahl	Zum Vergleich Säurezahl des daraus gewonnenen Zellstoffs
Baumwolle, roh, ausgereift	1,0016	7,32	(1,56)
Weizenhalm, reif, gesund, Basis . . .	0,9663	5,61	(4,79) *
Weißbuchenholz, gesund, 120jährig, Holzmehl	1,1894	8,68	(—)
Fichtenholz (Schliff)	1,0725	8,32	(4,72) *
Kiefernholz, Kern, 120jährig, Holzmehl	1,2579	9,27	(7,50) *

* Siehe *M. Lüdtke*, Papier-Fabrikant **32**, 528, 1934, Tabelle 15.

Der hohe Säurewert der Rohbaumwolle ist durch die sauren Stoffe der Kutikula bedingt. Das geht aus Tabelle II hervor, die wiedergibt, wie die Säurezahl bei jeder weiteren Messung derselben Probe ansteigt. Diese Erscheinung ist auf die allmähliche Spaltung der Kutikularsubstanz, die einen Ester darstellt[1], zurückzuführen. Sie wird von den zur Messung benutzten Agenzien, in erster Linie wohl von der Salzsäure,

Tabelle II. Säurezahlen von roher, ausgereifter Baumwolle in normaler Calciumacetatlösung bei wiederholter Messung des gleichen Objekts.

Einwaage trocken ber.	Säurezahlen			
	Messung I	Messung II	Messung III	Messung IV
1,3410	7,32	9,40	10,08	11,04

[1] Siehe hierzu: *Fargher*, J. Textile Institute **14**, T. 49, 1923; **15**, T. 337, 1924; *Clifford, Higginbotham, Fargher*, ebenda **15**, T. 120, 1924; *Clifford, Probert*, ebenda **15**, T. 401, 1924; *Fargher, Higginbotham*, ebenda **15**, T. 419, 1924; *Lecomber, Probert*, ebenda **16**, T. 338, 1925; *Fargher*, J. Soc. Dyers Colorists **40**, 283, 1924; *Chibnall, Piper, Pollard, Williams, Sahai*, Biochem. J. **28**, 2189, 1934.

bewirkt. Äußerlich kommt die Esterspaltung in einer besseren Feuchtigkeitsaufnahme und Durchtränkung zum Ausdruck. Die Auffindung der Spaltung war nur dadurch möglich, daß die benutzte Calciumacetatmethode das *gleiche* Objekt mehrmals zu messen erlaubt, was bei Anwendung von Verfahren, die Alkali gebrauchen, nicht möglich ist, da sich die sauren Bestandteile zum guten Teil in der Lauge lösen und dadurch einer zweiten Bestimmung entgehen.

2. Nachdem sich gezeigt hatte, daß es nicht angängig ist, kleine Mengen von Fremdsubstanzen in Naturprodukten zu vernachlässigen, um etwa vorhandene, zur Cellulose gehörige Säuregruppen festzustellen, wurde versucht, die Begleitstoffe ohne Veränderung der übrigen Substanzen zu entfernen. Zu diesem Zwecke wurde rohe Baumwolle mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Benzol und Alkohol behandelt[1]. Eine völlige oder nahezu völlige Entfernung der sauren Bestandteile gelang in unserem Falle nicht, wie Tabelle III zeigt. Die Kutikularsubstanzen waren noch hervorragend am Zustandekommen der Säurezahl beteiligt.

Tabelle III. Säurezahlen von roher Baumwolle, nach Extraktion mit Alkohol—Benzol.

	Einwaage trocken ber.	Säurezahlen		
		Messung I	Messung II nach 48 Std.	Messung III nach 120 Std.
a) 8 g 4 Tage mit 400 ccm Äthylalkohol + 400 ccm Benzol extrahiert, 22°	1,2522	11,30	12,23	12,23
b) 8 g 4 Tage mit 400 ccm Methylalkohol + 400 ccm Benzol extrahiert, 22°	1,2624	12,28	14,36	14,33
c) 2 g 40 Std. mit 65 ccm Äthylalkohol + 65 ccm Benzol im Soxhlet extrahiert. Extraktionstemperatur 68°	1,2052	10,32	10,56	10,60

3. Es wurde dann versucht, durch $2^1/_2$stündiges Erhitzen in 3 %iger Sodalösung bei Wasserbadtemperatur die Säure der Kutikula zu entfernen. Auch das war nicht möglich, sie blieb auf der Faser erhalten. Ihre Menge hatte sich nach Tabelle IV durch die Behandlung eher noch etwas erhöht.

4. Nachdem Mittel der Extraktion zur Entfernung der Kutikularsubstanzen bei Baumwolle nicht zum Ziele führten, wurden Verfahren geprüft, die durch oxydierende Wirkung die Begleitstoffe entfernen,

[1] Analog *Schmidt, Schnegg, Jandebeur, Hecker, Simson*, Ber. **68**, 542, 1935.

Tabelle IV. Säurezahlen von roher Baumwolle, zunächst mit Benzol—Alkohol extrahiert (s. Tabelle III), dann $2^1/_2$ Stunden mit 3%iger Sodalösung in siedendem Wasserbad erhitzt und ausgewaschen.

	Einwaage trocken ber.	Säurezahl nach Extraktion mit Alkohol—Benzol	Säurezahl nach Extraktion mit 3%iger Sodalösung
Probe a (s. Tabelle III) . . .	1,2522	12,23	13,11
Probe b (s. Tabelle III) . . .	1,2624	14,33	14,75

und zwar wurde die Beseitigung zunächst durch abwechselnde Behandlung mit verdünntem Chlorwasser und Ammoniak vorgenommen. Tabelle V läßt den Ablauf dieser Prozesse bei 16 bzw. 24° erkennen. Der Temperaturunterschied hat, wie man sieht, keinen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Bleiche. In beiden Fällen kommt es durch das Chlorwasser zu einer Oxydation, die Säuregruppen erzeugt. Durch Ammoniak wird ein beträchtlicher Teil der oxydierten Substanz entfernt. Nach je dreimaliger Behandlung war die Baumwollfaser nahezu rein weiß und die Säurezahl hatte ein Minimum erreicht. Bei weiterer Einwirkung von Chlorwasser stieg die Säurezahl allmählich wieder an. Neuerliche Ammoniakbehandlung verringerte sie aber nicht. Der Substanzverlust war in dieser Phase (Ziffer VII bis IX, Tabelle V) nur noch sehr gering und überstieg nicht 0,5%. Auch bei höherer Temperatur und Erhöhung der Chlorkonzentration ging die Säurezahl kaum noch

Tabelle V. Verfolgung der Bleiche von Baumwolle durch die Säurezahl. Bleiche mit 0,1%igem Chlorwasser und 0,5%iger Ammoniaklösung, die je etwa 24 Stunden mit dem Material zusammenblieben. Vor Zugabe einer anderen Lösung wurde zunächst ausgewaschen. 1 g Baumwolle auf 100 ccm Lösung. Zwei Ansätze bei 16 bzw. 24°.

Nach Behandlung mit	Säurezahl 24°	Säurezahl 16°	Farbe der Proben
I. Chlorwasser	15,48		Gelblich
II. Ammoniak	6,27	6,62	Gelbbraun
III. Chlorwasser	6,06	6,12	Gelblich
IV. Ammoniak	3,00	2,76	Gelblich
V. Chlorwasser	3,14	2,94	Weiß
VI. Ammoniak	3,11	2,54	Ganz schwach gelblich, Filtrat nahezu farblos, Ausbeute 93,14%
VII. Probe VI. 17 Tage in 0,18%igem Chlorwasser	—	5,18	Weiß
VIII. Probe VII. 24 Std. in 0,4%igem Ammoniak	—	5,43	Weiß
IX. Probe VIII. 4 Tage in 0,18%igem Chlorwasser	—	6,08	Weiß

hinauf und blieb etwa bei 6,5 stehen (Tabelle VI, Ziffer I bis III). Daß sie hier praktisch zum Stillstand kam, dürfte auch daraus hervorgehen, daß beim Kochen einer Probe mit der Säurezahl 5,18 in 3 %iger Sodalösung der Säuregehalt sich auf 4,35 erniedrigte, aber eine erneute Chlorwasserbehandlung ihn nicht mehr erhöhte (Tabelle VI, Ziffer IV und V). Aus dem allmählichen Anstieg der Säurezahlkurve nach Erreichen des Minimums geht eindeutig hervor, daß die Säuregruppen

Tabelle VI. Säurezahlen von gebleichter Baumwolle, die verschiedene Zeit in Chlorwasser aufbewahrt wurde.

Behandlung	Einwaage trocken ber. g	Säurezahlen	Säurezahl, nachdem die Proben in 100 ccm 3 %iger Sodalösung 2 Std. in siedendem Wasserbad erhitzt und ausgewaschen worden waren
I. Rohe Baumwolle bis zum Erscheinen einer rein weißen Farbe mit 0,1 %igem Chlorwasser und 0,5 %igem Ammoniak gebleicht	1,0016	2,45	1,56, hellgelbes Filtrat, nach nochmaligem Sodaauszug Säurezahl 1,3
II. Probe I weitere 72 Std. bei 22° in 0,1 %igem Chlorwasser aufbewahrt. 1 g in 200 ccm	0,9448	4,96 4,65	2,31, gelbbraunes Filtrat
III. Probe I weitere 72 Std. bei 22° in 0,38 %igem Chlorwasser aufbewahrt. 1 g in 200 ccm	0,9965	6,50 6,74	3,38, braunes Filtrat
IV. Probe I weitere 17 Tage in 150 ccm 0,18 %igem Chlorwasser	0,9440	5,18	4,35
V. Probe IV nach Sodaauszug erneut 4 Tage in 150 ccm 0,18 %igem Chlorwasser	0,9440	3,78	3,30

wenigstens zu zwei Drittel sekundärer Natur sind. Da anzunehmen ist, daß die Oxydierung des durch Ammoniak nicht entfernbaren Anteils schon vor der Entfernung der Kutikularsubstanz, also in den ersten 6 Tagen eingesetzt hat und etwa mit gleicher Geschwindigkeit vor sich gegangen ist wie in der restlichen Zeit, so besteht viel Wahrscheinlichkeit dafür, daß bei Beginn der Oxydation praktisch gar keine Säuregruppen vorhanden waren, also der gesamte Säuregehalt sekundär entstanden ist. Beachtet man ferner, daß der größere Teil der Säure durch die Sodaauskochung entfernt werden kann (Tabelle VI, Ziffer I) und native Cellulose, auch wenn sie eine Säure wäre, hiergegen beständig sein müßte, so ergibt sich, daß mindestens dieser Anteil nicht der Cellulose

zugehören kann, sondern Begleitsubstanzen. Dem Einwand, daß die Säuregruppen durch die Sodalösung abgespalten sein könnten, muß mit der Frage begegnet werden, warum denn die Abspaltung nicht mit einmaliger Auskochung beendet ist, sondern sich ständig in stets geringerem Grade vermindert und schließlich etwa bei der Säurezahl 1,3 bis 1,5 halt macht. Bei Vorliegen einer einheitlichen Cellulosesäure wäre doch ein anderes Verhalten zu erwarten.

5. Kürzlich wurde von *Schmidt* und Mitarbeitern angegeben, daß native Baumwollcellulose einen konstanten Säuregehalt von 0,28 % CO_2 (entsprechend einer Säurezahl von 6,4 nach unserer Methode) besitze und diese Zahl ein Kennzeichen für native Cellulose sei[1]. Da das Material durch das Chlordioxydverfahren gewonnen worden war, bestand für uns die Notwendigkeit, zu prüfen, wie die Säurezahlen bei Anwendung von Chlordioxyd als Oxydationsmittel und unserem Meßverfahren ausfallen. Zur Untersuchung gelangten drei Präparate. Das erste war aus roher Baumwolle durch Behandlung mit einem Gemisch von Chlordioxyd und Pyridin gewonnen worden. Das zweite wurde ebenso erhalten, doch folgte noch eine fünftägige Nachbehandlung mit 1 %iger Pyridinlösung. Das dritte machte eine abwechselnde Behandlung mit 0,25 %iger Chlordioxydlösung und Natriumsulfit durch. Einzelheiten sind der Tabelle VII zu entnehmen. Die Säurezahlen, die von den Präparaten

Tabelle VII. Bleiche von roher Baumwolle mit Chlordioxyd und Pyridin bzw. Natriumsulfitlösung.

Behandlung	Einwaage trocken ber.	Ausbeute trocken ber.	Ausbeute %	Farbe
I. 400 ccm 0,25%iges ClO_2. Nach 1 Std. 7,5 ccm 30%iges Pyridin zugesetzt. 5 Tage Schüttelmaschine. Destilliertes Wasser ausgewaschen . .	3,8400	3,4878	92,94	Weiß
II. Wie I. Danach noch 5 Tage mit 400 ccm 1%iger wässeriger Pyridinlsg. geschüttelt. Ausgewaschen	3,7313	3,4502	92,47	Ganz schwach rötlich
III. 300 ccm 0,25%iges ClO_2. Nach 24 Std. abgesaugt, gewaschen, mit 300 ccm destilliertem Wasser und so viel 2%igem Na_2SO_3 versetzt, daß $p_H = 6{,}9$. Diese Behandlung noch zweimal wiederholt. Ausgewaschen	3,7185	3,5096	94,38	Schwach rötlich

[1] *Schmidt* u. Mitarbeiter, Ber. **68**, 542, 1935; **69**, 366, 1936.

erhalten wurden, finden sich in Tabelle VIII, Spalte 3. Präparate II und III weisen gegenüber I, aus saurer Lösung stammend, einen geringeren Wert auf. Nachträgliche Behandlung mit 3%iger Sodalösung nahm auch hier einen Teil der Oxydationsprodukte heraus, was an der gelben Farbe des Natriumcarbonatauszuges und der kleineren Säurezahl (Spalte 4) zu erkennen war[1]. Ein achttägiges Aufbewahren derselben

Tabelle VIII. Säurezahlen von Baumwolle nach Chlordioxydbleiche und Behandlung mit 3%iger Sodalösung.

1	2	3	4	5	6	7	8
	Einwaage trocken	Säurezahl	Säurezahl nach Sodaextraktion*	Säurezahl nach ClO_2-Behandlung**	Säurezahl nach der 2. Sodaextraktion*	Säurezahl nach der 3. Sodaextraktion*	Verlust durch sämtliche Bewirkungen %
Präparat I, Tab. VII	0,9473	6,40	3,76	3,48	2,76	2,41	3,49
„ II, „ VII	0,9260	5,54	3,76	3,60	2,96	2,54	4,47
„ III, „ VII	0,9014	5,01	3,89	3,77	3,05	2,86	3,86
„ II, „ VII	0,9432	—	—	5,81	3,57	3,16	2,80

* 2 Std. mit 100 ccm 3%iger Sodalösung in siedendem Wasserbad behandelt. — ** 8 Tage in 100 ccm 0,25%iger Chlordioxydlösung gelegen.

gründlich ausgewaschenen Präparate in 100 ccm 0,25%iger Chlordioxydlösung veränderte die Säurezahl nicht (Spalte 5). Hiernach fördert erneutes Ausziehen mit 3%iger Sodalösung in siedendem Wasserbad weitere, aber stets geringer werdende Mengen Oxydationsprodukt zutage (Spalten 6 und 7). Der Gesamtverlust, den die Proben während all dieser Behandlungen erfuhren, ist aus Spalte 8 zu entnehmen; er lag zwischen 3 und 4%. Man erkennt das gleiche Verhalten der Präparate wie bei der Chlorbleiche. Das Minimum kann natürlich bei dem Einstufenverfahren nicht beobachtet werden. Für die Zugehörigkeit der Säuregruppen zur Cellulose gelten die gleichen Argumente, die in Abschnitt 5 vorgebracht wurden.

6. Zur Klärung des Restes an noch offenstehenden Fragen wurde weiterhin geprüft, wie sich die Verhältnisse in Medien gestalten, denen ein basisches Mittel zugesetzt ist. Tabelle IX gibt die Erfahrungen wieder, die mit einem Gemisch von Chlorwasser und Ammoniaklösung sowie mit einem solchen von Chlorwasser und wässerigem Pyridin gemacht wurden. Im ersteren Falle wurde rohe Baumwolle bzw. reifer Weizenhalm mit einem Gemisch von 900 ccm 0,2%igem Chlorwasser und 30 ccm 8%igem Ammoniak versetzt. Nach Ablauf der Reaktion war die Lösung noch schwach basisch. Der Angriff auf die Cellulose

[1] Je intensiver die Farbe, desto größer der Verlust an Säure.

Tabelle IX. Vergleich der Säurezahlen und Ausbeuten bei Aufschluß in verschiedenen Medien.

	Rückstand ist weiß gebleicht nach	Reaktion des Oxydationsmediums nach erfolgter Oxydation	Ausbeute %	Säurezahl
Rohe Baumwolle:				
a) 4 g in einem Gemisch von 900 ccm 0,2%igem Chlorwasser und 30 ccm 8%igem Ammoniak	8maliger Behandlung	Basisch	72,5	4,20
b) 4 g abwechselnd in 600 ccm 0,2%igem Chlorwasser und in 600 ccm 0,5%igem Ammoniak; zwischen jeder Änderung des Mediums Faserstoff mit Wasser gewaschen	3maliger Behandlung	Sauer	93,14	2,45
Reifer Weizenhalm:				
c) 3 g in einem Gemisch von 800 ccm 0,2%igem Chlorwasser und 30 cm 8%igem Ammoniak	23maliger Behandlung	Basisch	20,63	4,24
d) 3 g abwechselnd in Chlorwasser und Ammoniak wie unter b)	8maliger Behandlung	Sauer	51,87	4,79
e) 3 g in einem Gemisch von 900 ccm 0,2%igem Chlorwasser und 20 ccm 50%igem wässerigen Pyridin	23maliger Behandlung	Schwach sauer	41,59	15,78

und das Xylan ist in basischem Medium (a und c) stärker als in saurem (b und d), wie aus den Ausbeutezahlen hervorgeht. Im ammoniakhaltigen Mittel werden die oxydierten Anteile auch leichter gelöst und entgehen dadurch der Erfassung. In einem weiteren Versuch wurde das Chlorwasser mit Pyridin versetzt und zum Zellwandmaterial gegeben. Nach Ablauf der Oxydation reagierte die Lösung schwach sauer. Es zeigt sich, daß die Säurezahl im Vergleich zu der normal aufgeschlossenen Materials (b und d) außerordentlich hoch ist. Zusatz von basischen Mitteln zum Chlorwasser, um diesem die Azidität zu nehmen, konnte die Bildung von Säuregruppen nicht verhindern, sondern hat sie im letzteren Falle sogar noch begünstigt.

7. Nachdem sich gezeigt hatte, daß durch oxydierende Methoden erhaltenes Material nicht geeignet ist, die gestellte Frage restlos zu lösen, wurden Zellstoffe gewählt, die im Sulfitprozeß gewonnen worden waren. Ungebleichter Zellstoff dieser Art hat bekanntlich Sulfonsäurereste, die Säurefunktion besitzen. Es wurde versucht, einmal durch Bestimmung des Schwefelgehaltes und dann durch Ermittlung der Gesamtsäurezahl den den COOH-Resten zukommenden Anteil festzustellen (Tabelle X). Angenommen wird dabei, daß jede Sulfogruppe

noch ein Äquivalent frei hat. Da das Material neben der Cellulose noch Xylan, Mannan, Lignin und die Hautsubstanz aufweist, so werden etwa auftretende COOH-Reste nicht ohne weiteres für eine „Cellulosesäure" sprechen. Im anderen Falle ist zwar ein neues Argument gegen den Säurecharakter der Cellulose erhalten worden, aber kein endgültiger Beweis; denn es läßt sich der Einwand machen, daß die Carboxylgruppen während des technischen Aufschlusses abgespalten worden seien. Die Messung ergab eine Gesamtsäurezahl von 7,88 (in alkoholischer Kaliumacetatlösung[1]). Die Sulfonsäurereste würden rund 3,00 ccm n/100 NaOH beansprucht haben (Spalte 4), so daß für Säurereste anderer Art 4,9 ccm übrig bleiben (Spalte 6). Diese Zahl kommt einem früher für gebleichten Sulfitzellstoff gefundenen Wert von 4,72 gleich[2]. Also auch hier keine eindeutige Antwort.

Tabelle X. Gesamtsäurezahl und Menge der SO_3H-Reste in ungebleichtem Sulfitzellstoff.

1	2	3	4	5	6
Einwaage trocken	Erhalten $BaSO_4$ mg	$BaSO_4$ auf 1 g Substanz ber. mg	SO_3H-Reste in ccm n 100 mol. Lösung ausgedrückt	Säurezahl in alkoholischer Kaliumacetatlösung	An COOH-Resten vorhanden (Spalte 5 minus Spalte 4) ccm n/100 Lösung
1,3281 g, oxydiert mit $KMnO_4$ . .	9,4	7,078	3,03	7,88	4,85
1,5026 g, oxydiert mit Bromlauge .	10,2	6,788	2,91	7,88	4,97

8. Daß den Begleitstoffen wesentlicher Anteil an der Bildung der Säurezahl zukommt, geht auch aus folgenden Versuchen hervor, zu denen verschiedene technische Sulfitzellstoffe (Fichte) mit verschieden hohem α-Cellulosegehalt und verschiedener Viskosität verwandt wurden. Man erkennt aus Tabelle XI, daß die Säurezahl dem Reinheitsgrad folgt, aber nicht abhängig ist von der Viskosität. Wäre sie eine Funktion der Kettenlänge der Cellulose und sekundär entstanden, so müßten die niedrigviskosen Stoffe die höchsten Säurezahlen aufweisen, auf jeden Fall höhere, als die hochviskosen Stoffe mit gleichem α-Cellulosegehalt. Tabelle XI zeigt weiter, daß sich auch hier die Säurezahlen durch verdünntes Chlorwasser oder niedrigkonzentrierte Chlordioxydlösung nicht heraufreiben lassen. Zwei Versuche, durch Behandlung mit normaler Calciumacetatlösung (die ganz schwach basisch ist) und molarer Calcium-

[1] *M. Lüdtke*, Technologie und Chemie der Papier- und Zellstoff-Fabrikation **31**, 37, 1934. — [2] Papier-Fabrikation **32**, 530, 1934, Tabelle 15.

Tabelle XI. Säurezahlen von Fichtenholz(Sulfit)zellstoff, gebleicht, verschiedener Viskosität und verschiedenen α-Cellulosegehalts. Bestimmungen in n Ca-Acetat. Verhältnis der oxydierenden Agenzien zur Substanzmenge: 60 ccm auf 1 g. Verhältnis der Calciumsalzlösungen zur Substanzmenge: 100 ccm auf 1 g.

	Säurezahl der technischen Produkte	Säurezahl, nachdem die Proben 72 Std. in 0,168 % ClO_2 gelegen	Säurezahl, nachdem die Proben 72 Std. in 0,186 % Cl_2 gelegen	Säurezahl nach 2 Std. Erhitzen in n Ca-Acetat, Wasserbad	Säurezahl nach 2 Std. Erhitzen in mol. $CaCl_2$-Lösung, Wasserbad
96 %ige α-Cellulose, niedrigviskos	2,70 2,63	2,63	2,62		
96 %ige α-Cellulose, hochviskos	3,30 3,48	3,46	3,43		
92 %ige α-Cellulose, niedrigviskos	3,20 3,25	3,13	3,18		3,02
92 %ige α-Cellulose, hochviskos	3,94 4,14	3,98	4,22		
Kunstseidenzellstoff	4,89 4,98	4,41	4,69	4,68	

chloridlösung (mit schwach saurer Reaktion) in der Hitze eine Veränderung zu erzielen, schlugen fehl.

9. Nachdem festgestellt war, daß ein gleichbleibender Säurewert für die Cellulose nicht existiert, blieb noch zu klären, ob vielleicht die Membran als Ganzes eine konstante Säurezahl besitze. Zu diesem Zwecke wurden die natürlichen Auf- und Abbaustadien in den Kreis der Betrachtung gezogen. Da sich die Membranstoffe allmählich bilden und in dem Gesamtwachstum eine Übereinstimmung hinsichtlich physiologischer Leistung und physikalischer Beschaffenheit besteht, woran auch die Molekülgröße der einzelnen Komponenten Anteil hat[1], wären nach der Bleiche bzw. dem Aufschluß von jungem, nicht ausgereiftem Zellwandmaterial höhere Säurezahlen als bei reifem zu erwarten. Zur Prüfung wurde der aus jungen, noch in geschlossener Kapsel befindlichen Baumwollsamenhaaren, aus jungen Trieben von Kiefer und Fichte sowie aus jungen Weizenhalmen isolierte Zellstoff einer Bestimmung der Säurezahl unterworfen.

Tabelle XII zeigt zunächst, daß sich die Begleitsubstanzen der Cellulose in den jungen Baumwollhaaren in viel höherem Maße geltend machen, als es bei reifem Material der Fall ist (vgl. Abschn. 1 und Tabelle II). Auch hier wird die Kutikularsubstanz allmählich durch die

[1] *M. Lüdtke*, diese Zeitschr. **233**, 1, 1931; Cellulosechemie **12**, 307, 1931; **13**, 169, 191, 1932; **14**, 1, 1933; diese Zeitschr. **268**, 372, 1934.

Tabelle XII. Säurezahlen von roher, nicht ausgereifter Baumwolle in normaler Calciumacetatlösung bei mehrmaliger Messung des gleichen Objekts.

Einwaage trocken ber.	Säurezahl			
	Messung I	II	III	IV
0,9006	20,78	39,33	43,16	47,24

zur Bestimmung der Säurezahl verwandten Reagenzien aufgespalten. Bei Extraktion desselben Materials mit 5%iger Natronlauge weisen die unreifen Fasern infolge des Vorhandenseins von Intercellosen einen weit größeren Verlust auf als das reife Produkt. Es verloren beispielsweise bei Behandlung von 1 g Substanz mit 200 ccm 5%iger Natronlauge (2 Tage lang unter Umschütteln gut verschlossen bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt) reife Baumwolle 5,1% und unreife 24,28%. Dasselbe gilt für die mit Chlorwasser und Ammoniak vorsichtig gebleichten Samenhaare und für die aus Kiefern- und Fichtentrieben sowie jungem Weizenhalm isolierten Zellstoffe (Tabelle XIII und XIV). Sie zeigen viel höhere Säurewerte als solche reifen Materials unter gleichen Bedingungen.

Die Ergebnisse scheinen zunächst für eine Beziehung der Kettenlänge zum Säuregehalt zu sprechen. Wenn man aber beachtet, daß die Menge der Begleitstoffe und Intermediärprodukte außerordentlich hoch ist und von ihnen nach der Bleiche (Tabelle XIII) noch erhebliche Anteile zurückgeblieben sein dürften und wenn man sich der Ergebnisse der vorhergehenden Abschnitte erinnert, dann wird man auch hier nicht ohne weiteres der Cellulose bzw. ihren Zwischenprodukten, den Intercellosen, Säuregruppen zusprechen. Hierdurch soll die Frage, ob die Bildung der Cellulose über Stoffe mit saurem Charakter läuft, aber nicht

Tabelle XIII. Verlust bei der Bleiche von reifen und unreifen Baumwollsamenhaaren mit Chlorwasser und Ammoniak sowie Natronlaugeextraktion.

Ausgangsmaterial trocken ber.	Behandlung	Ausbeute	Behandlung	Ausbeute
Reife Baumwolle 1,3410 g	3mal mit je 100 ccm 0,20%igem Chlorwasser u. 0,5%igem Ammoniak gebleicht. Nach jedem Wechsel des Mediums ausgewaschen	1,2490 g = 93,14%	In 90 ccm 5%ige NaOH (frisch bereitet) 24 Std. bei 19° unter gelegentlichem Umschütteln	1,1978 g = 89,32%
Unreife Baumwolle 0,9006 g	Wie oben	0,5716 g = 63,47%	Wie oben, in 40 ccm	0,4860 g = 53,97%

Tabelle XIV. Säurezahlen von Zellstoffen aus reifem und unreifem Ausgangsmaterial. Gewinnungsmethode der Zellstoffe: 0,2%iges Chlorwasser und 0,5%iges Ammoniak in Wechselwirkung. Keine Nachbehandlung.

	Einwaage trocken ber. g	Säurezahl
Weizenzellstoff		
aus reifem Halm	0,9663	4,79
aus unreifem Halm, kurz vor dem Schossen	1,0388	6,89
Kiefernzellstoff		
Splint, Stamm, 120 Jahre, November gefällt, einschließlich Markstrahlzellen	1,2331	7,70
aus Trieben, einschließlich Markzellen, Oktober gepflückt	1,2081	11,81
Baumwolle		
reife Samenhaare	1,2490	2,30
unreife Samenhaare, aus geschlossener Kapsel	0,5716	5,34

verneinend beantwortet werden; zur endgültigen Beantwortung bedarf es einer weiteren Untersuchung an einer größeren Materialmenge als uns zur Verfügung stand.

10. Nach Angaben einiger Autoren hat das Kalium in Form seiner Düngesalze einen günstigen Einfluß auf die Ausbildung der Kohlenhydrate der Zellwand. Es war deshalb notwendig, zu prüfen, ob dieser Einfluß sich auch bei der Bestimmung der Säurezahl bemerkbar macht. Zu diesem Zwecke wurde der Zellstoff junger, mit verschiedenen Kalimengen ernährten Weizenpflanzen, die unter sonst gleichen Bedingungen gezogen worden waren, auf seinen Säuregehalt geprüft. Wie Tabelle XV zeigt, weichen die Ergebnisse praktisch nicht voneinander ab. Man darf daher annehmen, daß durch das Kali zwar Verschiedenheiten hinsichtlich der absoluten Menge aber nicht hinsichtlich der Erscheinungen, die zur Säurezahl führen, hervorgerufen werden.

Tabelle XV. Weizenzellstoff aus jungem Halm. Verschieden ernährtes Ausgangsmaterial. Säurezahlen in n Calciumacetatlösung.

	Einwaage trocken	Säurezahl
Weizenzellstoff, normal ernährt	1,0388	6,89
Kalimangelernährung	1,0151	7,09
Kaliüberschußernährung	1,0214	7,21

11. Eine weitere Untersuchung widmeten wir den Veränderungen, welche die Membran durch Pilzbefall erleidet. Da diese Veränderungen zum guten Teil durch Oxydation entstehen und sich in der Ausbildung von Carboxylgruppen kundgeben, so kann man den Pilzangriff durch Messung der Säurezahl verfolgen. In Tabelle XVI sind Proben verholzten, von

Tabelle XVI. Säurezahlen von pilzbefallenem Holz und daraus hergestelltem Zellstoff in n Calciumacetatlösung. Der Zellstoff wurde durch 0,2 %iges Chlorwasser und 0,5 %iges Ammoniak in Wechselwirkung gewonnen. Nachbehandlung fand nicht statt.

Holz und darauf wachsender Pilz	Holzmehl, Säurezahl	Zellstoff	
		Säurezahl	Charakter
Kiefernholz, Polyporus vaporarius . .	17,99	8,52	gut faserig
„ Lenzites abietina . . .	26,10	10,38	filmartig
„ Merulius lacrymans . .	47,96	15,09	faserig
Weißbuchenholz, Armillaria mellea .	17,37	14,33	„
Fichtenholz, Coniophora cerebella . .	32,98	10,78	„
Holz von Polyporus fomentarius befallen	36,70	13,76	filmartig
Weizenhalm, reif, Basis von Fußkrankheitspilzen (Cercosporella herpotrichoides, Ophiobolus graminis, Fusarium culmorum und nivale) befallen	8,29	7,12	pulverig

Pilzen veränderten Materials auf ihre Säurezahl geprüft worden. Allgemein zeigt sich, daß die Säurezahl höher, oft beträchtlich höher ist als die des Ausgangsmaterials. (Vgl. Tabelle I.) Bei den Veränderungen muß also die Oxydation in *allen* Fällen eine Rolle gespielt haben.

Der aus dem verpilzten Material durch Aufschluß mit Chlorwasser und Ammoniak gewonnene Zellstoff weist ebenfalls hohe Säurezahlen auf (Tabelle XVI). Es ist zwar sehr wahrscheinlich, daß die Entstehung der Säuregruppen zum guten Teil der Einwirkung des Pilzenzyms zuzuschreiben ist, doch ist das, da der Aufschluß mit oxydierenden Mitteln erfolgte, nicht einwandfrei erwiesen. Hier treten die gleichen Schwierigkeiten auf, die wir schon eingangs kennen lernten.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

A. Säurezahlen natürlicher Zellmembranen.

Natürliche Zellwände besitzen einen Säuregehalt, der denjenigen gebleichten bzw. aufgeschlossenen Materials übertrifft. Aus diesem Grunde müssen auch die bei diesem Aufschluß entfernten Substanzen der Kutikula bzw. Mittellamelle sauren Charakter haben, der natürlich im allgemeinen infolge Salzbildung verdeckt ist. Aus den Tabellen I und II des Abschnittes 1 sowie Tabelle XII, Abschnitt 9, geht hervor, daß dieser Säuregehalt sogar beträchtlich sein kann. Für die hier nicht aufgeführten Bastfasern, wie Flachs, Hanf, Ramie u. a. gilt das gleiche, wie wir bereits in einer früheren Abhandlung zeigten[1]. Der saure Charakter des Pektins, das in diesem Falle hauptsächlich für die Säurewirkung verantwortlich zu machen ist, ist ja bekannt. Eine Behandlung mit neutralen Extraktionsmitteln, wie Benzol-Alkohol, änderte hieran

[1] Papier-Fabrikation **32**, 509, 528, 1934, Abschn. 16.

nur wenig und wir konnten uns nicht davon überzeugen, daß durch dieses Mittel die gesamte säurehaltende Substanz bis auf einen geringen Rest, den man unbedenklich der Cellulose zusprechen könnte, extrahiert wurde (Abschnitt 2, Tabelle III). Selbst Behandlung mit heißer 3%iger Sodalösung brachte bei ungebleichter Baumwolle diesen Vorgang nicht zuwege (Abschnitt 3, Tabelle IV).

B. Säurezahl und Bleiche bzw. Aufschluß.

Das Auftreten eines Minimums an Säuregruppen bei der Bleiche der Baumwolle durch verdünntes Chlorwasser und Ammoniak zeigt eindeutig, daß wenigstens die Hauptmenge der Säurereste sekundären Ursprungs ist. Verfolgt man die Säuremenge mit der Zeit (siehe das Kurvenbild und Abschnitt 4, Tabellen V und VI), so ergibt sich ein schneller Abfall, der der Aufoxydation und Entfernung der Kutikularsubstanz entspricht, gefolgt von einem langsamen Anstieg, der eine andere Substanz betrifft. Im tiefsten Punkte ist die Faser bereits weiß gebleicht und die extrahierende Ammoniakflüssigkeit farblos. Der Anstieg der Säurezahl könnte eine Oxydation der Cellulose darstellen, um so mehr, als es unter den gegebenen Umständen schwer ist, über eine Säurezahl von etwa 6,5 hinauszukommen. Man könnte also der Meinung sein, daß nunmehr die Endgruppen der Cellulose völlig in Carboxylgruppen umgewandelt wären[1]. Aber eine Behandlung mit 3%iger Sodalösung lehrt, daß der größte Teil der Säure extrahierbar ist und nur ein kleiner Teil (Säurezahl 1,3 bis 1,5) mehrmaliger Extraktion widersteht. Das ist einer der Gründe, die gegen die Annahme der Aufoxydation endständiger Gruppen der *Cellulose* sprechen. Die Cellulose sollte, auch wenn sie in Form einer hochmolekularen Säure vorliegt, nicht löslich sein (Abschnitt 4). Man kann hiergegen einwenden, daß bei der Sodabehandlung nicht das ganze Cellulosemolekül in Lösung geht, sondern nur ein abgespaltener Teil. Gegen einen solchen Einwand spricht aber die Tatsache, daß eine neuerliche Aufoxydation des Restkörpers bei den gegebenen Bedingungen nicht möglich ist. Diese Er-

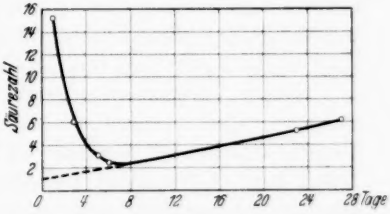


Abb. 1.

[1] Siehe hierzu *E. Schmidt* u. Mitarbeiter, Ber. **68**, 542, 1935. Wenn wir die von den Autoren genannte Zahl von 0,28% CO_2 nur ungefähr finden, so dürfte das daran liegen, daß unsere Methode feinere Unterschiede festzustellen gestattet, was bei Titration mit n/10 Säure natürlich nicht möglich ist.

scheinung des Stillstandes der Oxydation bei einer bestimmten Säurezahl ist nicht nur bei der Baumwolle zu beobachten, sondern zeigt sich auch bei mit Chlorkalk gebleichtem Sulfitzellstoff (Fichtenholztracheiden), wie der Tabelle XI, Abschnitt 8, zu entnehmen ist. Erneute Oxydation mit Chlorwasser oder Chlordioxyd blieb auch hier ohne Wirkung.

Der durch verdünnte Sodalösung leicht lösliche Anteil der Säure ist also nicht der Cellulose zuzusprechen. Es bleibt noch die Frage offen, ob vielleicht die nicht entfernbare Menge der Carboxylgruppen an die Cellulose gebunden ist. Wenn man beachtet, daß bei der Bleiche der Baumwolle (Tabelle V, Abschnitt 4) die Oxydation jener Stoffe, die zum Anstieg der Säurekurve führte, auch schon in den ersten 6 Tagen der Bleiche mit derselben Geschwindigkeit vor sich gegangen sein dürfte wie späterhin (siehe die gestrichelte Kurve in der Abbildung), so ist sehr wahrscheinlich, daß auch dieser Teil der Säurereste nicht zur Cellulose zu rechnen ist, sondern Begleitsubstanzen zugeschrieben werden muß. Native Cellulose, wenigstens die Cellulose der Baumwolle, wäre hiernach praktisch frei von Carboxylgruppen.

Ist eine Aufoxydation durch eine sauer reagierende Lösung von Chlor oder Chlordioxyd also nicht möglich, so läßt sich ein solcher oder ähnlich ablaufender Vorgang beobachten, wenn man ein basisches Mittel zum chlorierenden hinzufügt (Tabelle IX, Abschnitt 6). Behandelt man das Material jetzt ebenfalls solange, bis es einen weißen Farbton angenommen hat und die Ammoniaklösung farblos bleibt, was eine sehr viel häufigere Wiederholung verlangt, so ist die Ausbeute außerordentlich gesunken. Der Aufschluß greift in diesem Falle die Kohlenhydrate weit stärker an, als bei getrennter Anwendung der Agenzien.

Die vorstehenden Ausführungen zeigen eindeutig, daß es nicht angängig ist, einen Gehalt von 0,28% Carboxyl als „Merkmal der nativen Zusammensetzung" der Cellulose zu bezeichnen und die Cellulose als alleinigen Träger dieser Säuremenge anzusprechen, sondern daß die Säure, wenigstens zum allergrößten Anteil, sekundär durch das oxydierende Agens entstanden ist und anderen Substanzen angehört. Wir zweifeln nicht, daß bei den aus einem Gewebe stammenden Membranen der gleiche Vorgang zu beobachten ist wie bei der Baumwollfaser, wenn er auch nicht so deutlich in Erscheinung treten dürfte, da das Material bis zur Entfernung der Mittellamellensubstanz länger im Chlorwasser liegt und während dieser Zeit die Aufoxydation der Restmembran weiter vorgeschritten sein wird, als bei der nur kurze Zeit in Behandlung stehenden Baumwolle. Es besteht kein Zweifel, daß den Begleitsubstanzen besondere Bedeutung als Träger der sauren Gruppen zukommt und da die gebleichte Baumwolle, soweit wir wissen, neben der Cellulose nur noch die Hautsubstanz enthält, dürfte es kein Trugschluß

sein, dieser die Säuregruppen zuzusprechen, wie wir es früher schon aus anderen Gründen tun mußten[1].

Da wir unsere Bestimmungen in einer Calciumacetatlösung vornehmen, muß auf eine Literaturangabe eingegangen werden, wonach Kalksalze die Säuregruppen abzuspalten vermögen[2]. Wie Tabelle XI, Abschnitt 8, zeigt, veränderten weder das schwach basisch wirkende Calciumacetat noch das schwach sauer reagierende Calciumchlorid die Säurezahl des benutzten Zellstoffs während zweistündigen Erhitzens im siedenden Wasserbad bei Anwendung einer normalen bzw. molaren Lösung der erwähnten Salze und auch bei Zimmertemperatur war ein solcher Einfluß nicht festzustellen[3]. Natürlich besteht die Möglichkeit, daß leicht lösliche Oxydationsprodukte zuweilen durch die Salzlösung herausgenommen werden, doch ist dies kein Abspalten von Carboxylgruppen, sondern ein einfacher Lösungsvorgang.

Ferner noch eine Bemerkung zur Wirkung der Aufschlußmittel. Wir haben immer empfohlen, zur Isolierung der Zellwände aus dem Gewebe und zur Bleiche etwa 0,2%iges Chlorwasser und 0,4- bis 0,5%iges Ammoniak bei Zimmertemperatur in Wechselwirkung zu benutzen, und zwar wird das zweite Reagens zugegeben, wenn das erste mit Wasser ausgewaschen ist und umgekehrt. Zahlreiche frühere Versuche wie auch die Tabellen dieser Mitteilung (siehe besonders Tabelle V und IX) lehrten, daß unter diesen Bedingungen die Cellulose vollständig gewonnen wird und eine Veränderung der Begleitstoffe der Sekundärwand auf ein Minimum herabgesetzt ist. Dasselbe gilt nicht bei Anwendung eines Gemisches von oxydierenden und lösenden Agenzien. Das scheint auch beim Einstufenverfahren mit Chlordioxyd und Pyridin der Fall zu sein, wie man einer Mitteilung von *Yüan-Chi Tang* und Mitarbeitern entnehmen muß[4]. Unsere frühere Angabe, daß Chlorwasser und Chlordioxydlösung im Prinzip die gleiche Wirkung zeitigen[5], findet hierdurch erneut ihre Bestätigung.

C. Betrachtung der Säurezahl von Zellstoffen aus unreifem und krankem Material.

Sowohl unreifes als auch von Pilzen oder Bakterien befallenes Zellwandmaterial und der daraus gewonnene Zellstoff zeigen höhere, zum Teil weit höhere Säurezahlen als reife und gesunde Ausgangsstoffe (Abschnitt 9 und 10). Bei unreifen Produkten liegen die Verhältnisse wahrscheinlich ebenso wie bei reifem Material, doch ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die Säure wenigstens zum Teil nativen Ursprungs ist. In diesem Falle müßte der Aufbau über saure Zwischenprodukte laufen. Anders ist es bei den im Abbau begriffenen Stoffen. Hier dürften die Säuregruppen in der Hauptsache primär vorliegen und der Tätigkeit der Pilze ihr Entstehen verdanken, nicht der sekundären Wirkung des Aufschlußmittels. Für die Mittellamellensubstanzen der untersuchten Hölzer und des Weizenhalms ist das bestimmt der Fall,

[1] Papier-Fabrikation **32**, 531, 1934, Tabelle 16. — [2] *Schmidt, Schnegg, Hecker*, Naturwiss. **21**, 206, 1933. — [3] *M. Lüdtke*, diese Zeitschr. **268**, 383, 1934. — [4] *Yüan-Chi Tang* u. Mitarbeiter, Cellulosechemie **16**, 57, 1935. — [5] *M. Lüdtke*, diese Zeitschr. **233**, 25, 1931.

wie die Versuchsergebnisse, die im Ausgangsmaterial eine höhere Säurezahl feststellen als in dem daraus isolierten Zellstoff, zeigen. Was letzteren anbelangt, so läßt sich ein klarer Entscheid nicht treffen, da zum Aufschluß oxydierende Agenzien verwendet wurden. Beachtet man aber, daß bei der Humifizierung oder sonstiger Veränderung durch Bakterien und Pilze die Oxydation eine ausschlaggebende Rolle spielt, so wird die Annahme, daß auch in diesem Falle mindestens ein Teil der Säuregruppen bereits vorhanden war und nicht durch das Aufschlußmittel hineingekommen ist, sehr wahrscheinlich.

Verschiedenheit der Kaliernährung hatte, obgleich sie die Entwicklung der Pflanze stark beeinflußt und besonders die Ausbildung des Kohlenhydratanteils fördern soll, auf den Säuregehalt des Zellstoffs junger Pflanzen keinen sichtbaren Einfluß (Abschnitt 10).

D. Carboxylgehalt und Kettenlänge.

Es gibt vier Möglichkeiten, das Vorhandensein der sauren Gruppen, die bis auf verschwindende Anteile als Carboxylgruppen anzusprechen sind[1], zu erklären.

1. Die Säurereste können natürliche Bestandteile des Cellulosemoleküls sein.
2. Die Säuregruppen können aus bestimmten Gruppierungen der Cellulose durch die oxydierende Behandlung entstanden sein.
3. Die Säurereste gehören nicht zur Cellulose, sondern zu irgendwelchen Begleitstoffen bzw. deren Spaltprodukten.
4. Mehrere der vorstehenden Möglichkeiten sind Ursache des Säuregehalts der Membran.

Man erkennt, daß nur in den ersten beiden Fällen die Säurezahl eine Konstante abgeben könnte und zur Errechnung der Kettenlänge brauchbar sein würde. Vielleicht könnte man den Punkt vier noch in Betracht ziehen, nämlich dann, wenn es gelingt, etwaige Carboxylreste der Cellulose scharf von den übrigen zu trennen. Der Fall 1 ist bereits durch die vorhergehenden Erörterungen als nicht mit den Versuchen in Übereinstimmung befindlich erkannt worden und scheidet aus.

Viel Wahrscheinlichkeit scheint die Möglichkeit 2 für sich zu haben, da ja nach allgemein geltender Auffassung das Kettenmolekül Cellulose an einem Ende eine Aldehydgruppe (in Halbacetalform) besitzt, die durch oxydative Vorgänge zur Säuregruppe geworden sein könnte. Die vergleichenden Versuche mit Zellstoff aus reifen und unreifen Pflanzen (Abschnitt 9) bzw. Geweben scheinen dieser Ansicht recht zu geben, denn ganz allgemein weisen die Proben aus unreifem Material

[1] Technologie u. Chemie der Papier- u. Zellstoff-Fabrikation **31**, 37, 1934.

höhere Säurezahlen auf als die anderen. Aber wenn man mit Chlorkalk gebleichten Sulfitzellstoff mit hohem α-Cellulosegehalt, der also weitgehend von seinen Begleitstoffen befreit ist, auf seinen Säurewert prüft, so zeigt der niedrigviskose Stoff regelmäßig eine kleinere Säurezahl als der höherviskose mit gleichem α-Cellulosegehalt (Tabelle XI), während bei Annahme der Abhängigkeit der Viskosität von der Kettenlänge und der Aufoxydation der endständigen Aldehydgruppe zur Säuregruppe das Umgekehrte der Fall sein sollte. Auch eine Nachbleiche mit Chlorwasser oder Chlordioxydlösung ändert an dem Säurewert nichts. Bei Baumwolle zeigt sich dasselbe Bild: Das mit Soda- oder Ammoniaklösung zur Entfernung leichtlöslicher Bestandteile behandelte Material erhöht seinen Säurewert bei nachträglicher Chlorwasserbleiche nicht (Tabelle VI).

Aus allem geht hervor, daß es nicht möglich ist, die endständige Gruppe mit Aldehydcharakter bei den gegebenen Bedingungen so aufzuoxydieren, daß sich Carboxylgruppen bilden, deren Bestimmung zu einer Berechnung der Kettenlänge dienen könnte. Auch die Oxydation mit zweiwertigem Kupfersalz oder Jodlösung ist bekanntlich keine Operation, die lediglich diese Gruppe betrifft. Um das Bild zu vervollständigen, ist ein Hinweis auf andere Verhältnisse und Kohlenhydrate nicht überflüssig. In einer früheren Mitteilung war bereits auf die Verschiedenheit im Carboxylgehalt von Kunstseide aus Linters und solcher aus Zellstoff hingewiesen worden. Im letzteren Falle lag der Säuregehalt bedeutend höher[1]. Die Zahlen waren etwa dieselben wie die Ausgangsstoffe sie hatten. Für das Mannan A ist von *Klages*[2] eine Kettenlänge von etwa 71 bis 86 Mannoseresten angegeben worden (durch Bestimmung der 2, 3, 4, 6-Tetramethylmannose aus Methylmannan), und *Meyer* und *Mark* nehmen β-glucosidische Bindung an[3]. Eine ebensolche Bindung und eine Kettenlänge von 75 bis 80 Pyranoseresten (Viskositätsmessung) wird von *Haworth* und Mitarbeitern einem Xylan aus Espartozellstoff zugeschrieben[4]. Für native Cellulose, die ebenfalls β-glucosidisch ist, werden bekanntlich sehr viel höhere Polymerisationsgrade (bis zu 1200 Glucosereste aus Viskositätsmessungen[5]) genannt. Wenn man hiergegen die Säurezahlen, von Cellulose (bestgereinigte

[1] Angewandte Chemie **48**, 650, 1935. — [2] *F. Klages*, Ann. **509**, 172, 1934. — [3] *Meyer* u. *Mark*, Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe, S. 168, Leipzig 1930. — [4] *Hampton*, *Haworth*, *Hirst*, J. Chem. Soc. London **1929**, S. 1739; *Haworth*, *Percival*, ebenda **1931**, S. 2850; *Haworth*, *Hirst*, *Oliver*, ebenda **1934**, S. 1917. In dieser letzten Arbeit finden die Autoren 6% Arabinose im Espartoxylan und möchten es daher mehr den Pflanzengummen zurechnen als der Cellulose, entgegen früheren Angaben. Das Espartoxylan soll keine Säuregruppen aufweisen. — [5] *Staudinger*, *Schweitzer*, Ber. **63**, 3121, 1930; *H. Staudinger*, Die hochmolekularen organischen Verbindungen, S. 508, Berlin 1932.

Baumwolle), von Mannan A und von Xylan (aus Weizenstroh) setzt, die nach dem Jodid-Jodatverfahren[1] erhalten wurden[2] (Baumwolle 1,01; Mannan A 1,81; Xylan 18,50), so erkennt man, daß eine Beziehung zwischen Kettenlänge und Säurezahl nicht gut existieren kann.

Auch die Bakteriencellulose ist kein geeignetes Objekt zur Beweisführung, denn ihr ganzes Verhalten deutet nicht darauf hin, daß sie mit der Cellulose höherer Pflanzen identisch wäre[3]. Mit diesen Ausführungen dürfte deutlich gemacht worden sein, daß der Säuregehalt in seiner Gesamtheit auch nicht sekundär aus der Cellulose entstanden sein kann. Damit scheidet Fall 2 der genannten Möglichkeiten aus.

Wenn man beachtet, daß mit fortschreitender Reinigung der Zellwandprodukte der Säuregehalt nicht zunimmt, wie es der Fall sein sollte, wenn die Säuregruppen nur der Cellulose angehörten, sondern erheblich geringer wird, so gewinnt die dritte der Möglichkeiten erheblich an Wahrscheinlichkeit. Der höhere Säuregehalt der Koniferenzellstoffe gegenüber dem der Baumwolle könnte z. B. von dem darin enthaltenen Xylan herrühren, vorausgesetzt, daß sich das Xylan des Holzes wie Weizenstrohxylan verhält. Durch den Nachweis, daß Sodalösung keine Spaltung einer hypothetischen Cellulosesäure, sondern eine Lösung (vielleicht unter gleichzeitiger Spaltung) anderer saurer Stoffe bewirkt, ist ebenfalls sehr wahrscheinlich geworden, daß die Carboxylgruppen unter normalen Umständen, d. h. soweit nicht Oxycellulose vorliegt, überhaupt nicht zur Cellulose zu rechnen sind. Doch läßt sich der Beweis insofern nicht mit letzter Konsequenz führen, als es nicht gelingt, die saure Substanz völlig zu entfernen bzw. sie mengenmäßig bestimmten Stoffen zuzuordnen. Wir sind hiermit bereits bei Punkt 4 angelangt, der eine Kombination verschiedener Möglichkeiten für die Entstehung des Säuregehalts annimmt. Stellt man einmal eine unverbindliche Berechnung des Polymerisationsgrades einer Baumwollcellulose mit der Säurezahl von 1,3 bis 1,5 und von Fichtenholzzellstoffen mit der Säurezahl 2,63 bis 4,98 (Tabelle XI) an, so erhält man schwankende Werte von 410 bis 475 Glucoseresten für Baumwolle und 124 bis 235 Glucoseresten für Fichtenholzcellulose. Die Verschiedenheiten im Säuregehalt

---

[1] Technologie und Chemie der Papier- und Zellstoff-Fabrikation **31**, 37, 1934. — [2] Papier-Fabrikant **32**, 509, 528, 1934, Tab. 15. Das andere, offenbar auf konstitutionellen Verschiedenheiten beruhende Verhalten des Xylans gegenüber Cellulose und Mannan (auf das wir schon früher hinwiesen, diese Zeitschr. **233**, 45, 1931) tritt auch hier wieder in Erscheinung. — [3] *Eggert, Luft*, Zeitschr. f. physik. Chem. **7**, 468, 1930; *Grassmann, Stadler, Bender*, Liebigs Ann. **502**, 20, 1933; *M. Lüdtke*, diese Zeitschr. **268**, 383, 1934.

der einzelnen Materialien sprechen zusammen mit den oben genannten Argumenten nicht gerade überzeugend für Punkt 4.

Von den am Anfang dieses Abschnitts aufgezählten Möglichkeiten scheiden also 1 und 2 aus. Zwischen Fall 3 und 4 läßt sich mit Sicherheit nicht entscheiden, doch spricht vieles dafür, daß Punkt 3 das Phänomen richtig deutet. Die Säurezahl ist nach allem kein geeignetes Mittel zur Bestimmung der Kettenlänge der Cellulose, da die sauren Gruppen, wenn nicht vollständig, so doch zum allergrößten Teil gar nicht der Cellulose angehören, sondern Begleitsubstanzen. Sie bildet aber ein wertvolles Hilfsmittel zur Verfolgung von Oxydationsvorgängen, zur Charakterisierung von Zellwand- und anderem hochmolekularem und unlöslichem Material bzw. seinen einzelnen Komponenten und bei gleicher Vorbehandlung auch zum Vergleich untereinander.

Der Forschungsgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft spreche ich für die Überlassung einiger Apparate zur Durchführung der Untersuchung meinen wärmsten Dank aus.

Der Einfluß des Insulins auf den Lymphzuckerspiegel bei der Seidenraupe (Bombyx mori).

Von

Karel Wenig und **Jiří Joachim.**

(Aus dem Institut für die systematische Zoologie und der II. medizinischen Klinik, endokrinologische Gruppe des Prof. Dr. *J. Charvát*, Karls Universität Prag, ČSR.)

(Eingegangen am 14. Februar 1936.)

Über die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels bei den Arthropoden findet man in der Literatur nur spärliche Angaben, aus denen noch keine abgeschlossene Vorstellung über diese Frage gebildet werden kann.

Die Forschung stößt auf diesem Gebiet wegen der Kleinheit der Gliedertiere auf weitaus größere experimentelle Schwierigkeiten als bei den Wirbeltieren. Schon die Untersuchung des Lymphzuckers hat mit diesen Schwierigkeiten zu kämpfen. Aus einem einzelnen Tier kann man nur wenig Lymphe gewinnen, so daß eine Serienuntersuchung an ein und demselben Tiere nicht möglich ist und auf die Stoffwechselvorgänge nur durch den Vergleich der Ergebnisse bei einer größeren Zahl von Individuen geschlossen werden kann. Der Lymphzucker kann praktisch nur mit einer Reduktionsmethode bestimmt werden; diese erlaubt aber wegen der großen Restreduktion keine einfache Wertung der Ergebnisse. Man muß daher eine Methode wählen, die es gestattet, neben der Restreduktion auch den wahren Lymphzuckergehalt zu bestimmen.

Einzelne Befunde führen zur Annahme, daß bei den Arthropoden eine Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels existiert. *Hemmingsen* (1) fand beim Krebs (Potamobis astacus) nach Glucoseinjektion eine ähnliche glykämische Kurve wie bei den Wirbeltieren: nach dem Maximum fiel sie rasch bis unter den Ausgangswert ab — eine Analogie zum *Traugott*schen Phänomen —, um dann bis zum konstanten Werte zu steigen. Der Überschuß des Lymphzuckers wird nach diesem Autor als Glykogen gespeichert. *Roche* und *Dumazert* (2) stellten bei *Cancer pagurus* ziemlich konstante Werte des vergärbaren Zuckers in der Lymphe fest. Insulin und Adrenalin wirkten auf denselben nicht ein. Sie schließen daraus, daß bei diesem Tier eine Lymphzuckerregulation existiert, die aber nicht, wie bei den Wirbeltieren, durch Hormone bedingt wird. *Haratsuka* (3) nimmt an, daß es bei der Seidenraupe keine Regulation ähnlich wie bei den Vertebraten gibt, sondern daß die Lymphzuckermenge durch Entstehung resorptionsfähigen Zuckers im Darm reguliert wird, dessen Menge von derjenigen der Darmamylase abhängt. Er ist der Auffassung, daß der Seidenraupe die Fähigkeit fehlt, Glykogen zu speichern. Es muß dazu bemerkt werden, daß von *Bataillon* und anderen Forschern Glykogen gefunden wurde. Bezüglich der Frage, ob der Lymphzucker bei der Seidenraupe durch Insulin oder einen ähnlichen Stoff reguliert wird, kam *Hemmingson* (4) zu einem negativen Ergebnis; die von ihm angewandte Methode (*Hagedorn-Jensen*) erlaubte allerdings nur die Bestimmung der Gesamtreduktion.

Deshalb haben wir uns entschlossen, diese Versuche mit einer Methode zu wiederholen, welche den wahren Lymphzuckergehalt zu ermitteln gestattet.

Für den Versuch wurden erwachsene Raupen von Bombyx mori verwandt, die noch keine Zeichen der herannahenden Metamorphose zeigten. Alle bekamen ständig reichlich Futter.

Zu den Injektionen wurde das Insulin PZH. (hergestellt vom polnischen Staatlichen Gesundheitsinstitut) in zehnfacher Verdünnung mit n/1000 HCl verwandt. Das Insulin wurde mit einer Tuberkulinspritze, und zwar in einer Menge von 0,05 ccm, d. h. 0,1 klinische Einheiten pro Raupe, in die Seite des Tieres eingespritzt. In einer Kontrollserie wurde die gleiche Menge n/1000 HCl injiziert. Nach Abwaschen und Abtrocknen der Raupe wurde das Dorsalgefäß angestochen und die Lymphe in kleinen Reagensgläsern aufgefangen und aus diesen pipettiert. Zu den einzelnen Analysen wurden 0,2 bis 0,3 ccm Lymphe von einer oder mehreren Raupen verwandt.

Da wir fanden, daß sich die *Hagedorn-Jensen*sche Methode in der ursprünglichen Fassung für unsere Zwecke nicht gut eignet, modifizierten wir sie folgendermaßen: Eine abgemessene Menge Lymphe wurde mit 4 ccm n/15 H_2SO_4 versetzt und mit 1,6 ccm 2,5%iger Natriumwolframatlösung gefällt (5), filtriert, dreimal mit Wasser nachgewaschen und auf 25 ccm aufgefüllt. In 10 ccm dieses Filtrats wurde mit der *Hagedorn-Jensen*schen Methode die Gesamtreduktion bestimmt. Der Rest des Filtrats wurde mit einem Viertelvolumen dreimal gewaschener, zentrifugierter Hefe vermischt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde zentrifugiert, 10 ccm abpipettiert und darin die Restreduktion bestimmt (5). Gleichzeitig wurde stets ein Blindversuch mit Hefe allein gemacht und das Glucoseäquivalent des gefundenen Reduktionswertes von diesen Resultaten abgezogen. Die Glucosemenge wurde als Differenz der Gesamt- und der Restreduktion berechnet.

Bei normalen Raupen betrug die Gesamtreduktion 106,0 $\pm$ 5,3 mg-% (in Glucoseäquivalenten), die Restreduktion 83,5 $\pm$ 3,4 mg-%, der vergärbare Zucker war 20,5 $\pm$ 5,5 mg-%. Raupen, welchen nur HCl injiziert worden war, zeigten fast gleiche Resultate (99,0 $\pm$ 2,1; 75,8 $\pm$ 12,7; 21,0 $\pm$ 2,0 mg-%).

Nach der Insulininjektion betrug die Gesamtreduktion durchschnittlich 102,0 $\pm$ 8,9 mg-%, die Restreduktion 114,0 $\pm$ 11,6 mg-%. Wir sehen also, daß nach Insulininjektion der vergärbare Zucker aus der Lymphe verschwindet und statt seiner eine neue Substanz erscheint, die reduziert, aber durch die Hefe nicht entfernt wird (Tabelle).

Um uns zu überzeugen, daß die gefundenen Resultate durch keine Nebenfaktoren oder Fehler der Methodik bedingt waren, haben wir einige Kontrolluntersuchungen gemacht, deren Ergebnisse wir im folgenden zusammenfassend anführen.

Das Insulin PZH. reduziert in der verwendeten Menge und Verdünnung das *Hagedorn-Jensen*sche Reagens vor und nach der Hefeeinwirkung nur in ganz geringem Maße und kann daher keine Fehlerquelle bilden. n/1000 HCl hat, wie schon angeführt worden ist, keinen Einfluß auf die Lymphzuckerwerte.

Tabelle.

Nr.	Zustand der Raupen	Gesamtreduktion mg-%	Restreduktion mg-%	Vergärbarer Zucker mg-%
1	Ohne Injektion	106	68	38
2	„ „	111	86	25
3	„ „	100	88	12
4	„ „	94	99	— 5
5	„ „	95	79	16
6	„ „	91	74	17
7	„ „	126	88	38
8	Injektion von HCl	122	100	22
9	„ „ „	95	95	0
10	„ „ „	94	50	44
11	„ „ „	95	58	37
12	Injektion von Insulin, 20 Min. . .	109	115	— 6
13	„ „ „ 60 „ . .	143	170	— 27
14	„ „ „ 65 „ . .	95	104	— 9
15	„ „ „ 70 „ . .	90	111	— 21
16	„ „ „ 95 „ . .	86	97	— 11
17	„ „ „ 105 „ . .	89	91	— 2

Die Frage, ob unsere Methode auch in der Lymphe eine quantitative Zuckerbestimmung erlaubt, falls dort Substanzen vorkommen sollten, welche die quantitative Beseitigung des Zuckers beeinträchtigen könnten, suchten wir dadurch zu lösen, daß bekannte Mengen von Glucose zu Lymphe, deren Gesamtreduktion und Zuckergehalt vorher bestimmt worden war, hinzugefügt wurden. Die zugefügte Glucose verschwand quantitativ.

Wir haben weiter gefunden, daß in Glucoselösungen und im menschlichen Blut auch nach Insulinzugabe die Glucose quantitativ entfernt wird. Damit wird der Einwand ausgeschlossen, daß das Insulin durch das Verhindern der Glucosegärung in vitro den Anschein erwecken könnte, daß die Glucose in vivo verschwunden sei.

Zusammenfassung.

1. In der Lymphe der Seidenraupe (*Bombyx mori*) beträgt die Gesamtreduktion 106 ± 5,3 mg-% (in Glucoseäquivalenten), der vergärbare Zucker 22,5 ± 5,5 mg-%. Diese Zahlen stimmen mit denjenigen *Hemmingsens* überein.

2. Nach der Injektion von 0,1 klinischer Einheit Insulin verschwindet im Laufe einer Stunde der vergärbare Zucker aus der Lymphe. Die Gesamtreduktion bleibt dabei unverändert, was die Annahme *Hemmingsens* erklärt, daß das Insulin auf den Lymphzucker keinen Einfluß hat.

Literatur.

1) *A. M. Hemmingsen*, Skand. Arch. Physiol. **46**, 51, 1925. — 2) *J. Roche* u. *C. Dumazert*, C. r. Soc. Biol. **120**, 1225, 1935. — 3) *E. Haratsuka*, Bull. Sericult. Exper. Stat. Japan **6**, 457, 1925, zit. nach *Jordan*, Allgemeine vergl. Physiol. d. Tiere 1929. — 4) *A. M. Hemmingsen*, Skand. Arch. Physiol. **46**, 56, 1925. — 5) *J. P. Peters* u. *D. D. Van Slyke*, Quantitative clinical Chemistry **2**, 1932, Kapitel über Zuckerbestimmung.

Über den Einfluß der Kationen auf das Gärvermögen der Tumorzelle.

VI. Mitteilung:

Calcium und Magnesium (2. Teil).

Von **A. Lasnitzki.**

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Universitätsinstituts für Krebsforschung an der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 3. Februar 1936.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Wie ältere Untersuchungen[1] ergaben, wird das Gärvermögen der Tumorzelle weder durch Calcium noch durch Magnesium beeinflußt, wenn diese Kationen nach einer Gärperiode in kalium- und calciumfreier Ringerlösung dem Medium hinzugefügt werden. Es war nun von Interesse, zu prüfen, wie sich Calcium und Magnesium bei unmittelbarer Einwirkung auf die Tumorzelle verhalten, in Parallele zu entsprechenden, früher mitgeteilten Untersuchungen über die Wirkung des Kaliums[2]. Was das Calcium anbetrifft, so hatte sich bereits im Rahmen dieser Untersuchungen ergeben, daß die Gärintensität bei gemeinsamer Einwirkung von Kalium und Calcium stärker ansteigt als bei alleiniger Einwirkung von Kalium, ein Befund, der einen unmittelbar gärungsfördernden Einfluß des Calciums, allerdings für das kaliumhaltige Medium, erkennen ließ. Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich demgegenüber mit der Frage, ob das Calcium unter gleicher Bedingung auch im kaliumfreien Medium die Gärung der Tumorzelle steigert. Es wurde dabei die Wirkung zweier $CaCl_2$-Konzentrationen geprüft, 0,0018 Mol/Liter (der Normalkonzentration) und 0,0036 Mol/Liter[3], und wiederum die gemeinsame Wirkung von Kalium und Calcium zum Vergleich herangezogen. In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde dann die unmittelbare und nachträgliche Calciumwirkung miteinander verglichen. Daran schlossen sich entsprechende Untersuchungen über den Einfluß des Magnesiums an, mit Einwirkung von 0,0018, 0,0036 und 0,009 Mol/Liter $MgCl_2$. — Zu den Versuchen diente in erster Linie das *Jensen-Sarkom*. Nur einige Versuche über die Wirkung des Calciums wurden auch am *Flexner-Jobling-Carcinom* angestellt.

Methodik.

Messung der anaeroben Gärung nach *Warburg*. Flaschenförmige Gefäße mit leerem oder gefülltem Anhang (V_F = 2,0 bzw. 2,2 ccm, $K_{CO_2} \sim 1{,}5$)

[1] *A. Lasnitzki* u. *O. Rosenthal*, diese Zeitschr. **281**, 395, 1935. — [2] *A. Lasnitzki*, ebenda **264**, 285, 1933. — [3] Eine weitere Erhöhung der $CaCl_2$-Konzentration kam wegen der Gefahr der $CaCO_3$-Abscheidung nicht in Frage.

oder kästchenförmige Gefäße (V_F = 2,0 oder 3,0 ccm, $K_{CO_2} \sim 0{,}6$ bis 1,1), letztere meist für kleinere Gewebsmengen; Ringerlösung als Medium (Näheres s. unten); Gasraum: 5 Vol.-% CO_2 + 95 Vol.-% N_2; p_H: 7,47 *; Temperatur: 37,5°. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von 15 Minuten. Der für jedes Beobachtungsintervall bestimmte Gärungsquotient ($Q_M^{N_2}$) ist das Maß des Gärvermögens.

Ergebnisse.

1. Wirkung des Calciums und gemeinsame Wirkung von Kalium und Calcium.

Schnitte aus verschiedenen Teilen des gleichen Tumors wurden in Ringerl., Ca-Ringerl.$_1$, Ca-Ringerl.$_2$ und K, Ca-Ringerl. eingelegt und darin wie üblich gewaschen. Es folgte die Bestimmung der Gärintensität in den entsprechenden Lösungen. Fast stets wurden zwei solcher Versuchsreihen gleichzeitig und vom gleichen Tumor angesetzt.

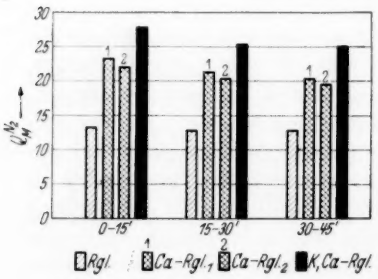


Abb. 1. Gärung des *Jensen*-Sarkoms in Ringerl., Ca-Ringerl.$_1$, Ca-Ringerl.$_2$ und K, Ca-Ringerl.

Die erhaltenen Gärungswerte zeigt im einzelnen Tabelle I, und man erkennt, daß der Zusatz des Calciums in allen Versuchen zu einer deutlichen Steigerung der Gärintensität geführt hat. Die mittleren Gärungsquotienten für das *Jensen*-Sarkom (aus je 12 Einzelbestimmungen im ersten und zweiten, je 11 im dritten Beobachtungsintervall) gibt außerdem Abb. 1 wieder. Für Ringerl. erhalten wir im ersten Beobachtungsintervall den Wert *13,3*, im zweiten und dritten die Werte *12,8* und *12,9*. Demgegenüber beträgt der mittlere Gärungsquotient in Ca-Ringerl.$_1$ *23,3* im ersten, *21,4* im zweiten und *20,4* im dritten Beobachtungsintervall. Nicht größer, sondern eher etwas geringer, ist die Gärintensität in Ca-Ringerl.$_2$. Die entsprechenden Werte sind *22,0*, *20,3* und *19,5*. Eine weitere Steigerung tritt aber in K, Ca-Ringerl. ein. Hier ergeben sich in den drei Beobachtungsintervallen mittlere Gärungsquotienten von *27,8*, *25,3* und *25,0*. Der mittlere Gäranstieg beträgt im ersten Beobachtungsintervall *75* % für Ca-Ringerl.$_1$, *65* % für Ca-Ringerl.$_2$ und etwa *110* % für K, Ca-Ringerl. In den späteren Beobachtungsintervallen ist die Förderung geringer. Für Ca-Ringerl.$_1$ und Ca-Ringerl.$_2$ sinkt sie bis zum dritten Beobachtungsintervall um $^1/_5$ bis $^1/_4$ des ursprünglichen Wertes, während für K, Ca-Ringerl. die Abnahme schwächer ist. Das Verhältnis $\frac{\text{Gäranstieg durch Ca}}{\text{Gäranstieg durch K + Ca}}$ beträgt

* Der in früheren Mitteilungen angegebene Wert 7,4 ist durch den genaueren Wert 7,47 zu ersetzen.

im ersten und zweiten Beobachtungsintervall fast 0,7 für Ca-Ringerl.$_1$ und etwa 0,6 für Ca-Ringerl.$_2$. Im dritten Beobachtungsintervall sind die Werte etwas geringer.

Eine sehr deutliche Beeinflussung der Gärintensität — bei an sich geringen Gärungswerten — zeigt der Einzelversuch mit dem *Flexner-Jobling*-Carcinom. Im ersten und zweiten Beobachtungsintervall steigt die Gärintensität in Ca-Ringerl.$_1$ etwa auf das Dreifache, in Ca-Ringerl.$_2$ fast auf das Vierfache. Ein wenig geringer ist die Zunahme im dritten Beobachtungsintervall.

2. *Unmittelbare und nachträgliche Calciumwirkung.*

Die Versuche bestanden aus zwei Abschnitten zu je drei Beobachtungsintervallen (Anordnung gemäß Mitteilung V). Abschnitt I: Messung der Gärung a) in Ca-Ringerl.$_1$, b) in Ringerl., c) in Ca-Ringerl.$_2$, d) in Ringerl. (Schnitte des gleichen Tumors; Vorbehandlung wie üblich). Darauf Überführung der beiden Ringerl. in Ca-Ringerl.$_1$ bzw. Ca-Ringerl.$_2$ durch Einkippen der entsprechenden Zusatzlösungen, und in gleicher Weise Zusatz von frischer Ca-Ringerl.$_1$ und Ca-Ringerl.$_2$ zu den schon vorhandenen gleichartigen Medien[1]. Ab-

Übersicht der Medien.

Medium	Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium	Ringerlösung *ohne* Kalium, *mit* Calcium (einfache Konzentration)	Ringerlösung *ohne* Kalium, *mit* Calcium (doppelte Konzentration)	Ringerlösung *mit* Kalium und Calcium	Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium, *mit* Magnesium (einfache Konzentration)	Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium, *mit* Magnesium (doppelte Konzentration)	Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium, *mit* Magnesium (fünffache Konzentration)
Kurze Bezeichnung:	Ringerl.	Ca-Ringerl.$_1$	Ca-Ringerl.$_2$	K, Ca-Ringerl.	Mg-Ringerl.$_1$	Mg-Ringerl.$_2$	Mg-Ringerl.$_5$
Zusammensetzung: NaCl	Mol/Liter 0,124	Mol/Liter 0,1215	Mol/Liter 0,119	Mol Liter 0,119	Mol/Liter 0,1215	Mol/Liter 0,119	Mol Liter 0,111
KCl	—	—	—	0,0025	—	—	—
$CaCl_2$	—	0,0018	0,0036	0,0018	—	—	—
$MgCl_2$	—	—	—	—	0,0018	0,0036	0,009
$NaHCO_3$	↓	↓	↓	0,025 Mol/Liter *	↑	↑	↑
Glucose	↓	↓	↓	0,2 %	↑	↑	↑

* Über eine Änderung der Bicarbonatkonzentration s. nebenstehende Fußnote [1].

[1] Sämtliche Zusatzlösungen waren bicarbonat*frei*. Zum Ausgleich war am Beginn von Abschnitt I die Bicarbonatkonzentration des Mediums auf 0,0275 Mol/Liter erhöht (Volumenverhältnis: 0,2 : 2,0 ccm). Der p_H-Anfangswert betrug demnach 7,51.

Tabelle I. Gärung des *Jensen*schen Rattensarkoms und des *Flexner-Jobling*schen Rattencarcinoms. Wirkung des Calciums und gemeinsame Wirkung von Kalium und Calcium.

Versuch Nr.	Datum	Alter des Tumors Tage	Medium: Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0—15′	15—30′	30—45′	Ringerlösung *ohne* Kalium, *mit* 0,0018 Mol/Liter $CaCl_2$ — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0—15′	15—30′	30—45′	Ringerlösung *ohne* Kalium, *mit* 0,0036 Mol/Liter $CaCl_2$ — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0—15′	15—30′	30—45′	Ringerlösung *mit* 0,0025 Mol/Liter KCl und 0,0018 Mol/Liter $CaCl_2$ — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0—15′	15—30′	30—45′
							a) *Jensen*-Sarkom.												
1	1932 13. I.	21	2,35	(13)	(11)	(11)	2,89	(28)	(25)	(25)	2,68	(30)	(25)	(25)	—	—	—	—
2	16. II.	17	6,02	11	12	12	6,01	23	22	21	5,58	21	21	20	5,58	20	22	26
3	16. II.	17	7,69	14	14	13	7,18	22	21	21	5,46	20	19	18	4,46	26	26	26
4	18. II.	19	6,26	15	14	14	5,72	27	25	24	5,86	27	24	24	4,05	36	30	29
5	18. II.	19	6,70	11	11	—	7,55	23	20	—	7,71	19	18	—	4,25	25	24	—
6	3. III.	16	5,46	14	13	14	5,86	26	25	24	5,19	28	25	24	3,58	34	30	29
7	3. III.	16	3,16	15	13	13	2,78	28	23	21	2,44	26	21	21	2,04	35	27	28
8	16. III.	15	4,99	16	15	15	2,94	26	24	22	2,67	21	19	17	2,80	31	27	26
9	16. III.	15	10,77	15	16	15	7,63	25	24	22	7,99	19	19	17	5,24	31	28	27
10	21. III.	16	2,71	6	5	6	2,80	18	17	16	2,64	16	15	14	1,96	22	21	20
11	21. III.	16	8,81	11	10	10	5,99	22	19	18	6,11	21	19	16	5,90	26	23	21
12	24. III.	19	8,67	17	16	16	5,22	21	21	19	6,43	23	22	22	5,29	24	23	22
13	24. III.	19	2,68	14	14	14	2,10	19	16	16	2,51	23	22	21	2,29	24	22	21
		Im Mittel:		**13,3**	**12,8**	**12,9**		**23,3**	**21,4**	**20,4**		**22,0**	**20,3**	**19,5**		**27,8**	**25,3**	**25,0**
							b) *Flexner-Jobling*-Carcinom.												
1	1933 6. IV.	29	5,25	5	4	5	6,37	14	13	12	6,41	17	17	15	—	—	—	—

schnitt II: Messung der Gärung a) in Ca-Ringerl.$_1$, b) in Ca-Ringerl.$_1$, c) in Ca-Ringerl.$_2$, d) in Ca-Ringerl.$_2$ — a) und c) *ohne*, b) und d) *mit* vorangegangener Gärung in Ringerl. Dauer des Intervalls zwischen beiden Abschnitten: 15 Minuten.

Wir betrachten zunächst die Versuche mit dem *Jensen*-Sarkom, deren Ergebnis in Tabelle II und Abb. 2 wiedergegeben ist (Mittelwertsbildung aus je sechs, im letzten Beobachtungsintervall je fünf Einzelbestimmungen).

Tabelle II. Gärung des *Jensen*schen Rattensarkoms. Unmittelbare und nachträgliche Calciumwirkung.

Versuch Nr.	Datum	Alter des Tumors Tage	Trockengewicht der Schnitte mg	Abschnitt I: $CaCl_2$-Konzentration	Abschnitt I: Gärungsquotienten 0–15′	15–30′	30–45′	Abschnitt II: $CaCl_2$-Konzentration	Abschnitt II: Gärungsquotienten 0–15′	15–30′	30–45′
	1932										
1	11. IV.	19	4,54	0,0018 Mol/Liter	23	22	20	0,0018 Mol/Liter	16	16	15
2	2. V.	16	5,45		25	23	21		19	18	16
3	25. V.	25	3,06		23	19	19		15	12	12
4	27. V.	27	2,65		21	20	18		11	11	9
	1933										
5	10. IV.	24	3,90		23	23	20		17	21	—
6	21. IV.	13	2,88		(34)	(33)	(29)		(28)	(24)	(23)
7	26. IV.	16	3,82		22	23	22		19	19	20
			Im Mittel:		**22,8**	**21,7**	**20,0**		**16,2**	**16,2**	**14,4**
	1932										
8	11. IV.	19	3,98	0	15	15	13	0,0018 Mol/Liter	12	12	12
9	2. V.	16	6,26		17	17	16		15	16	14
10	25. V.	25	4,86		16	14	14		13	11	11
11	27. V.	27	4,75		17	14	15		11	10	9
	1933										
12	10. IV.	24	4,97		12	12	12		11	11	—
13	26. IV.	16	3,74		15	14	13		15	15	15
			Im Mittel:		**15,3**	**14,3**	**13,8**		**12,8**	**12,5**	**12,2**
	1932										
14	11. IV.	19	4,43	0,0036 Mol/Liter	23	21	20	0,0036 Mol/Liter	16	16	16
15	2. V.	16	5,32		26	24	23		20	20	19
16	27. V.	27	2,86		25	19	20		14	13	11
	1933										
17	10. IV.	24	4,07		24	25	21		20	20	—
18	21. IV.	13	3,51		34	29	27		23	23	22
19	26. IV.	16	5,11		22	22	23		20	19	19
			Im Mittel:		**25,7**	**23,3**	**22,3**		**18,8**	**18,5**	**17,4**
	1932										
20	11. IV.	19	4,39	0	13	13	13	0,0036 Mol/Liter	10	11	11
21	2. V.	16	5,03		18	17	18		16	17	16
22	25. V.	25	5,52		(19)	(17)	(16)		(14)	(13)	(12)
23	27. V.	27	3,02		16	13	13		10	10	9
	1933										
24	10. IV.	24	3,70		8	8	6		6	8	—
25	21. IV.	13	2,32		12	11	10		10	11	12
26	26. IV.	16	3,85		13	14	14		15	17	16
			Im Mittel:		**13,3**	**12,7**	**12,3**		**11,2**	**12,3**	**12,8**

Während des ersten Abschnitts zeigt die Gärintensität in Ca-Ringerl.$_1$ fast die gleichen durchschnittlichen Werte wie in den vorstehenden Versuchen. Der mittlere Gärungsquotient beträgt im ersten Beobachtungsintervall *22,8* und sinkt bis zum dritten auf *20,0*. Etwas größer als früher ist hingegen die durchschnittliche Gärintensität in den korrespondierenden Versuchen mit Ringerl. Hier hat der mittlere Gärungsquotient im ersten Beobachtungsintervall den Wert *15,3*, im dritten den Wert *13,8*. Dementsprechend wird der mittlere Gäranstieg geringer als früher gefunden. Er beträgt im ersten und zweiten

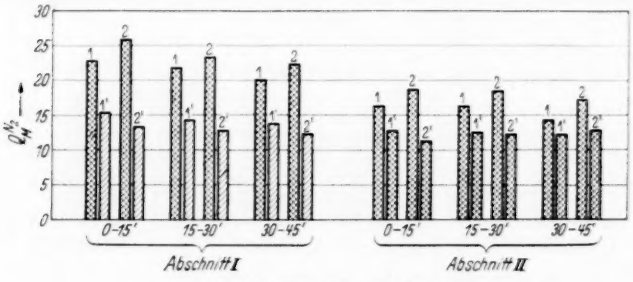


Abb. 2 Gärung des *Jensen*-Sarkoms.

Medium { Gruppe 1: Ca-Ringerl.$_1$ in Abschnitt I und II.
1': Ringerl. in Abschnitt I, Ca-Ringerl.$_1$ in Abschnitt II.
2: Ca-Ringerl.$_2$ in Abschnitt I und II.
2': Ringerl. in Abschnitt I, Ca-Ringerl.$_2$ in Abschnitt II.

Beobachtungsintervall etwa *50* %, im dritten *45* %. Beim Übergang von Abschnitt I zu Abschnitt II und im weiteren Verlauf des letzteren nimmt die Gärintensität in beiden Versuchsgruppen weiter ab, jedoch in Ca-Ringerl.$_1$ (gleich) absolut und relativ stärker als in Ca-Ringerl.$_1$ (nachträgl.). Der mittlere Gärungsquotient in Ca-Ringerl.$_1$ (gleich) hat im ersten und zweiten Beobachtungsintervall den Wert *16,2*, im dritten den Wert *14,4*. In Ca-Ringerl.$_1$ (nachträgl.) bewegt er sich zwischen *12,8* und *12,2*. Somit beträgt der mittlere Gäranstieg im Abschnitt II nur noch *25* bis *30* % im ersten und zweiten, weniger als *20* % im dritten Beobachtungsintervall.

Die Gärintensität in Ca-Ringerl.$_2$ ist während des Abschnitts I durchschnittlich etwas größer als bei den vorangehenden Untersuchungen, während die korrespondierenden Versuche mit Ringerl. nahezu die gleichen Durchschnittswerte wie dort zeigen. Für Ca-Ringerl.$_2$ ergibt sich ein mittlerer Gärungsquotient von *25,7* im ersten, von *22,3* im dritten Beobachtungsintervall[1]. Die entsprechenden Werte für Ringerl.

[1] Ein genauer Vergleich der mittleren Gärungswerte in Ca-Ringerl.$_1$ und Ca-Ringerl.$_2$ ist bei diesen Untersuchungen nicht möglich, da nicht alle für die Mittelwertsbildung verwendeten Einzelversuche miteinander korrespondieren. Dasselbe gilt für die beiden zugehörigen Versuchsgruppen mit Ringerl.

sind *13,3* und *12,3*. Der mittlere Gäranstieg beträgt im ersten Beobachtungsintervall fast *95* % und sinkt bis zum dritten auf etwa *80* %. Im ersten Beobachtungsintervall von Abschnitt II hat die Gärintensität in beiden Versuchsgruppen weiter abgenommen, jedoch in Ca-Ringerl.$_2$ (gleich) absolut und relativ stärker als in Ca-Ringerl.$_2$ (nachträgl.). Die mittleren Gärungsquotienten sind *18,8* und *11,2*, der mittlere Gäranstieg weniger als *70* %. Im weiteren Verlauf des zweiten Abschnitts steigt die durchschnittliche Gärintensität in Ca-Ringerl.$_2$ (nachträgl.) wieder etwas an (ohne den Anfangswert *13,3* nochmals zu erreichen), während sie in Ca-Ringerl.$_2$ (gleich) weiter sinkt. Der mittlere Garänstieg fällt infolgedessen weiter ab und beträgt im letzten Beobachtungsintervall nur noch etwa *35* %.

Ein etwas abweichendes Verhalten beobachten wir in einigen mit dem *Flexner-Jobling*-Carcinom angestellten Versuchen, deren Ergebnis Tabelle III und Abb. 3 zeigen (je drei Einzelbestimmungen). Die durchschnittliche Gärintensität ist hier in allen Beobachtungsintervallen kleiner und der mittlere (relative) Gäranstieg größer als bei den ent-

Tabelle III. Gärung des *Flexner-Jobling*schen Rattencarcinoms. Unmittelbare und nachträgliche Calciumwirkung.

Versuch Nr.	Datum	Alter des Tumors Tage	Trockengewicht der Schnitte mg	Abschnitt I: $CaCl_2$-Konzentration	Abschnitt I: Gärungsquotienten 0—15′	15—30′	30—45′	Abschnitt II: $CaCl_2$-Konzentration	Abschnitt II: Gärungsquotienten 0—15′	15—30′	30—45′
	1932										
1	3. XI.	?	5,32	0,0018 Mol/Liter	18	17	14	0,0018 Mol/Liter	13	13	12
2	3. XI.	?	4,51		16	14	13		11	11	10
	1933										
3	27. IV.	43	5,12		11	11	11		10	11	10
			Im Mittel:		**15,0**	**14,0**	**12,7**		**11,3**	**11,7**	**10,7**
	1932										
4	3. XI.	?	4,75	0	6	6	4	0,0018 Mol/Liter	5	4	4
5	3. XI.	?	4,16		7	6	5		4	4	4
	1933										
6	27. IV.	43	4,12		5	6	6		5	5	4
			Im Mittel:		**6,0**	**6,0**	**5,0**		**4,7**	**4,3**	**4,0**
	1932										
7	3. XI.	?	6,21	0,0036 Mol/Liter	20	17	14	0,0036 Mol/Liter	13	12	11
8	3. XI.	?	5,05		16	14	12		13	12	11
	1933										
9	27. IV.	43	4,20		10	11	11		9	10	9
			Im Mittel:		**15,3**	**14,0**	**12,3**		**11,7**	**11,3**	**10,3**
	1932										
10	3. XI.	?	5,89	0	11	9	8	0,0036 Mol/Liter	7	7	6
11	3. XI.	?	3,80		6	5	4		5	3	3
	1933										
12	27. IV.	43	3,58		3	6	4		4	4	4
			Im Mittel:		**6,7**	**6,7**	**5,3**		**5,3**	**4,7**	**4,3**

sprechenden Versuchen mit *Jensen*-Sarkom. Im ganzen genommen, erhalten wir in Ca-Ringerl.$_1$ und Ca-Ringerl.$_2$ während des ersten Abschnitts eine fast auf das $2^1/_2$fache gesteigerte Gärung. Der bereits im Abschnitt I erfolgte Abfall der mittleren Gärungsquotienten schreitet beim Übergang zu Abschnitt II und in dessen weiterem Verlauf noch etwas fort. Dabei ist er in Ca-Ringerl.$_1$ (gleich) und Ca-Ringerl.$_2$ (gleich) zwar absolut, aber nicht relativ größer als in Ca-Ringerl.$_1$ (nachträgl.) und Ca-Ringerl.$_2$ (nachträgl.). Infolgedessen bleibt hier der mittlere Gäranstieg annähernd konstant.

Allgemein läßt sich somit folgendes sagen: Bei nachträglichem Zusatz von Calcium zu K- und Ca-freier Ringerlösung steigt das Gärvermögen

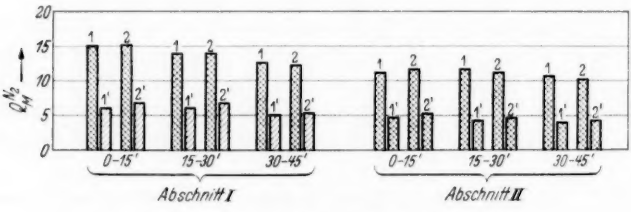


Abb. 3. Gärung des *Flexner-Jobling*-Carcinoms.

Medium { Gruppe 1: Ca-Ringerl.$_1$ in Abschnitt I und II.
" 1': Ringerl. im Abschnitt I, Ca-Ringerl.$_1$ in Abschnitt II.
" 2: Ca-Ringerl.$_2$ in Abschnitt I und II.
" 2': Ringerl. in Abschnitt I, Ca-Ringerl.$_2$ in Abschnitt II.

nicht an, sondern nimmt eher weiter ab. Auch bei unmittelbarer Einwirkung von Calcium nimmt das an und für sich gesteigerte Gärvermögen im Laufe des Versuchs ab. Dieser Abfall ist bei beiden Tumorarten absolut stärker als der in den Parallelversuchen mit nachträglichem Calciumzusatz, wodurch eine Annäherung der Gärungswerte zustandekommt. Beim *Jensen*-Sarkom ist er aber auch relativ stärker, was die unter der unmittelbaren Wirkung des Calciums erfolgte prozentuale Zunahme des Gärvermögens vermindert.

3. *Wirkung des Magnesiums.*

Schnitte aus verschiedenen Teilen des gleichen Tumors wurden in Ringerl., Mg-Ringerl.$_1$, Mg-Ringerl.$_2$ und Mg-Ringerl.$_5$ eingelegt und darin wie üblich gewaschen. Es folgte die Bestimmung der Gärintensität in den entsprechenden Lösungen. Im allgemeinen wurden zwei Ansätze mit Ringerl. gleichzeitig und vom gleichen Tumor ausgeführt, und die Zahl der parallel laufenden Ansätze mit Mg-Ringerl. betrug 2 bis 6. Nur in einem Teil der Fälle wurden alle drei Mg-haltigen Medien gleichzeitig untersucht.

Im ganzen liegen 23 Einzelbestimmungen mit Ringerl., 17 mit Mg-Ringerl.$_1$, 19 mit Mg-Ringerl.$_2$ und 10 mit Mg-Ringerl.$_5$ vor. Die Ergebnisse zeigt Tabelle IV. Bei der Bildung der Mittelwerte wurden

die Versuche mit Ringerl. in dreifacher Weise gruppiert[1], um für die Parallelversuche mit den drei Mg-haltigen Medien Vergleichswerte zu finden. Das Verhalten der mittleren Gärungsquotienten gibt Abb. 4 wieder. Man erkennt, daß die Gärintensität in den drei Mg-haltigen Medien durchschnittlich größer als in Ringerl. ist. Der Anstieg ist gering, aber immerhin deutlich. Er beträgt im ersten Beobachtungsintervall etwa *15%* für Mg-Ringerl.$_1$ und über *30%* für Mg-Ringerl.$_2$ und Mg-Ringerl.$_5$. Im weiteren Verlauf wird die Gärungsförderung dann noch geringer und sinkt bis zum dritten Beobachtungsintervall auf *5* bis *10%* für Mg-Ringerl.$_1$, weniger als *20%* für Mg-Ringerl.$_2$ und *15%* für Mg-Ringerl.$_5$.

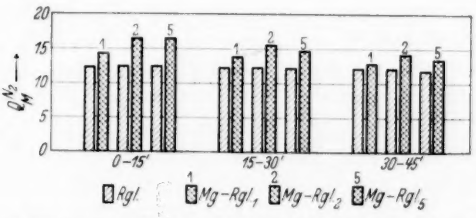


Abb. 4. Gärung des *Jensen*-Sarkoms in Ringerl., Mg-Ringerl.$_1$, Mg-Ringerl.$_2$ und Mg-Ringerl.$_5$.

Danach scheint es, daß auch das Magnesium bei unmittelbarer Einwirkung imstande ist, das Gärvermögen zu steigern. Verglichen mit der Gärungsförderung durch Calcium, ist die Wirkung des Magnesiums schwächer und erreicht ihr Maximum bei einer höheren (etwa der doppelten) Konzentration. Auch das Absinken der Wirkung im Verlaufe der Messung finden wir beim Magnesium wieder. Betrachtet man andererseits die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen, so bemerkt man, daß sie hier viel unregelmäßiger sind als bei der Untersuchung der Calciumwirkung. Neben Versuchen, die eine größere Förderung als die von den Mittelwerten angegebene zeigen, finden wir solche, in denen keine Förderung oder sogar eine Hemmung beobachtet wird. Auch liegt der maximale Effekt nicht immer deutlich bei Mg-Ringerl.$_2$. Die Wirkung des Magnesiums ist also viel unbestimmter als die des Calciums.

In einigen Versuchsreihen (Nr. 13 bis 14, 17 bis 23) wurde auch die *nachträgliche* Wirkung des Magnesiums (Mg-Ringerl.$_1$ und Mg-Ringerl.$_2$) geprüft, unter Benutzung der vorhandenen Ansätze mit Ringerl. Ein Einfluß konnte nicht beobachtet werden. Leider war aber gerade in der Mehrzahl dieser Versuche die unmittelbar fördernde Wirkung des Magnesiums ziemlich gering oder Null. Ein Vergleich der unmittelbaren und nachträglichen Magnesiumwirkung ist deshalb von keinem besonderen Werte und

[1] Gruppen zu 22, 23 und 11 Einzelbestimmungen.

Tabelle IV. Gärung des *Jensen*schen Rattensarkoms. Wirkung des Magnesiums.

Versuch Nr.	Datum	Alter des Tumors Tage	Medium: Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0–15′	15–30′	30–45′	Ringerlösung *ohne* Kalium und Calcium *mit* 0,0018 Mol/Liter $MgCl_2$ — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0–15′	15–30′	30–45′	*mit* 0,0036 Mol/Liter $MgCl_2$ — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0–15′	15–30′	30–45′	*mit* 0,009 Mol/Liter $MgCl_2$ — Trockengewicht der Schnitte mg	Gärungsquotienten 0–15′	15–30′	30–45′
	1932																	
1	2. II.	24	8,09	10	11	10	5,32	11	11	11	4,73	6	8	6	—	—	—	—
2	2. II.	24	5,03	10	11	11	4,50	16	15	13	3,44	9	8	8	—	—	—	—
3	22. II.	23	11,11	14	13	13	—	—	—	—	10,03	20	18	16	13,19	18	16	14
4	24. II.	25	3,83	7	7	7	3,86	7	7	8	4,26	14	14	13	—	—	—	—
5	24. II.	25	5,75	8	9	9	4,28	8	8	7	5,46	13	13	11	5,43	12	10	9
6	4. III.	17	8,37	16	15	16	9,12	20	19	19	5,84	17	17	16	—	—	—	—
7	17. III.	16	3,88	8	9	9	3,25	9	10	7	5,26	18	18	16	4,87	12	12	12
8	17. III.	16	2,20	11	9	9	1,22	9	8	9	2,85	20	18	19	1,46	9	7	8
9	23. III.	18	11,88	17	17	16	10,41	20	20	18	8,38	25	24	22	7,50	21	19	18
10	23. III.	18	2,81	12	12	11	2,47	21	20	17	3,39	19	17	17	2,93	21	19	17
11	6. IV.	18	9,48	18	16	15	5,89	17	14	14	5,25	18	16	15	5,85	17	15	14
12	6. IV.	18	2,96	12	12	10	2,40	15	15	13	3,00	18	16	15	2,43	17	14	11
13	13. IV.	21	5,58	14	16	14	5,69	16	17	16	—	—	—	—	—	—	—	—
14	13. IV.	21	6,76	16	16	15	—	—	—	—	5,69	18	17	16	—	—	—	—
15	26. IV.	17	7,31	17	15	16	6,27	20	20	18	7,17	21	20	19	5,18	20	19	17
16	26. IV.	17	3,07	14	14	14	4,73	18	17	15	3,93	20	19	18	2,10	18	16	15
17	9. V.	23	3,43	17	16	15	—	—	—	—	2,58	18	14	12	—	—	—	—
18	9. V.	23	5,23	15	13	13	3,33	15	13	11	—	—	—	—	—	—	—	—
19	9. V.	23	4,42	12	12	11	—	—	—	—	3,92	15	13	11	—	—	—	—
20	10. XI.	20	3,31	13	12	13	3,28	15	15	14	—	—	—	—	—	—	—	—
21	10. XI.	20	3,70	13	15	14	—	—	—	—	2,02	12	12	10	—	—	—	—
	1933																	
22	25. IV.	17	3,86	6	7	10	2,97	8	8	9	—	—	—	—	—	—	—	—
23	25. IV.	17	4,46	7	7	8	—	—	—	—	4,12	12	12	12	—	—	—	—

wir verzichten daher auf eine tabellarische Wiedergabe. Es ist indes wahrscheinlich — auch im Hinblick auf unsere früheren, am *Flexner-Jobling*-Carcinom angestellten Versuche[1] —, daß eine Steigerung des Gärvermögens durch nachträglichen Magnesiumzusatz auch dann immer ausbleiben wird, wenn begleitende Versuche mit sofortigem Magnesiumzusatz eine deutliche Gärungsförderung zeigen.

Diskussion.

Vergleichen wir die Wirkung des Calciums mit der des Kaliums[2], so können wir folgendes feststellen:

Bei unmittelbarer Einwirkung steigern beide Kationen das Gärvermögen der Tumorzelle sehr deutlich. Ihre gemeinsame Wirkung ist größer als jede Einzelwirkung; doch ist sie geringer als die Summe der Einzelwirkungen. Bei nachträglichem Zusatz zum Medium verhalten sich beide Kationen jedoch verschieden. Während das Kalium auch unter dieser Bedingung die Gärintensität steigert, und zwar nahezu ebenso stark wie bei unmittelbarer Wirkung, übt das Calcium keinen Einfluß aus. Oder mit anderen Worten: Die mit der Ausschaltung des Kaliums (im calciumfreien Medium) verknüpfte Gärungshemmung ist in einem hohen Grade reversibel, die mit der Ausschaltung des Calciums (im kaliumfreien Medium) verknüpfte Gärungshemmung dagegen irreversibel.

Das gleichartige Verhalten von Kalium und Calcium bei unmittelbarer und ihr verschiedenes Verhalten bei nachträglicher Wirkung bedarf einer Erklärung, und wir finden sie in der einfachen Annahme, daß die Wirkung des Calciums auf *indirekte* Weise zustandekommt, d. h. ganz auf die Wirkung des Kaliums zurückgeführt werden kann. Als Ausgangspunkt für unsere Betrachtung wählen wir am besten das frisch dem Tierkörper entnommene Tumorgewebe. Dasselbe hat einen bestimmten Kaliumgehalt. Unter der Voraussetzung, daß dieses Gewebskalium zum überwiegenden Teil diffusibel ist, wird durch Einbringen des Gewebes in kalium- und calciumfreie Ringerlösung sein K-Gehalt stark herabgesetzt werden, weniger dagegen oder gar nicht, wenn die Ringerlösung Kalium enthält („K-Ringerl."). Wir wollen nun annehmen, daß bei Gegenwart von Calcium die Abdiffusion des Kaliums aus der Tumorzelle gehemmt ist, womöglich infolge einer Abdichtung der Zellgrenzschicht, welche die Permeabilität für Kationen herabsetzt. Dann wird der K-Gehalt des Tumorgewebes in einer kaliumfreien, aber calciumhaltigen Ringerlösung ebenfalls größer sein als in kalium- und calciumfreier Ringerlösung. Ferner dürfte bei nachträglichem Zusatz von Kalium zum K- und Ca-freien Medium das Gewebe annähernd den gleichen K-Gehalt annehmen, den es bei sofortiger Übertragung in das K-haltige Medium nach gleicher Zeit erlangt. Wird dagegen Calcium

[1] *A. Lasnitzki* u. *O. Rosenthal*, l. c. — [2] Vgl. *A. Lasnitzki*, l. c.

nachträglich zugesetzt, also *nachdem* der diffusible Anteil des Kaliums bereits aus der Zelle entfernt ist, so kann dies den K-Gehalt des Gewebes natürlich nicht mehr beeinflussen. Wir haben damit eine gemeinsame Erklärung für den Anstieg des Gärvermögens unter der unmittelbaren Wirkung sowohl von Kalium als von Calcium und für das verschiedene Verhalten der beiden Kationen bei nachträglichem Zusatz zum Medium. Daß die Hinzufügung von Kalium zum calciumhaltigen Medium das Gärvermögen weiter steigert, ist ebenfalls klar. Dagegen ist ohne weiteres noch nicht verständlich, warum die gemeinsame Wirkung von Kalium und Calcium größer ist als die Wirkung von Kalium allein. Man sollte erwarten, daß der Zusatz von Calcium zu einem Medium, das etwa so viel Kalium wie das Blutplasma enthält[1], den K-Gehalt der Tumorzelle nicht beeinflußt, da vermutlich von Anbeginn und unabhängig von der Gegenwart des Calciums binnenzelliges und äußeres Kalium miteinander im Gleichgewicht sind. Diese Voraussetzung trifft aber möglicherweise — zum mindesten für die Bedingungen in vitro — nicht zu. Nehmen wir daher an, daß auch bei Übertragung des Gewebes in das K-haltige Medium für das Kalium ein Diffusionsgefälle Zelle → Medium besteht, das nur schwächer ist als im K-freien Medium, so könnte auch hier durch Zusatz von Calcium die Abdiffusion des Kaliums gehemmt werden und dadurch die Gärintensität zunehmen. Die vollständige Theorie sagt also aus, daß das Calcium sowohl im kaliumfreien als im kaliumhaltigen Medium die Abdiffusion des Kaliums aus der Tumorzelle hemmt und dadurch indirekt das Gärvermögen steigert, wobei die weitere Annahme gemacht wird, daß auch im kaliumhaltigen Medium (mit dem K-Gehalt des Blutplasmas) eine Abdiffusion von Kalium stattfindet.

Um diese Theorie zu prüfen, wurden Untersuchungen angestellt über den Einfluß, den das Medium (Ringerl., K-Ringerl., Ca-Ringerl.$_1$ und K, Ca-Ringerl.) auf den Kaliumgehalt des Tumorgewebes ausübt. Als Material diente das *Jensen*-Sarkom, und die Bedingungen entsprachen, soweit wie möglich, denen im Vorbereitungsstadium des Gärversuchs. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden. Hier sei nur gesagt, daß sie mit der Theorie in gutem Einklang stehen.

Setzt man voraus, daß die durch Calcium bewirkte Permeabilitätshemmung keine absolute ist, sondern daß eine geringe Permeabilität noch bestehen bleibt, so wird die Abdiffusion des Kaliums nicht völlig aufgehoben, sondern nur verzögert sein. Während sie daher im K- und Ca-freien und im K-haltigen, Ca-freien Medium am Beginn der Messungen ganz oder nahezu ganz beendet ist, wird sie in den Ca-haltigen Medien weiter fortschreiten (in Anbetracht der Versuchstemperatur wahrscheinlich in beschleunigtem

[1] 0,0025 Mol/Liter KCl.

Tempo), und dabei wird der K-Gehalt des Gewebes denjenigen Werten zustreben, die er für die entsprechenden Ca-freien Medien annimmt. Demnach müßte der Unterschied der Gärintensitäten in den Ca-haltigen und den entsprechenden Ca-freien Medien im Laufe des Versuchs immer geringer werden. Auch müßte die Dauer der Vorbereitungszeit, zum mindesten bei großen Unterschieden, auf die Größe der durch Calcium herbeigeführten Gärungssteigerung von Einfluß sein[1]. Für eine nicht aufgehobene, sondern nur verzögerte Abdiffusion des Kaliums sind Andeutungen vorhanden, wenn auch keine systematische Untersuchung in dieser Richtung angestellt wurde. So sank gemäß Tabelle I und Abb. 1 die mittlere Gärungsförderung in Ca-Ringerl.$_1$ und Ca-Ringerl.$_2$ bis zum dritten Beobachtungsintervall um ein Fünftel bis ein Viertel des Anfangsbetrages, während der Abfall in K-Ringerl. nach den früher mitgeteilten Untersuchungen[2] nur etwa ein Zehntel betrug (bei einer Anfangsförderung, die mit der für Ca-Ringerl.$_1$ übereinstimmt, und nahezu identischen Gärungswerten in Ringerl.). Bei längerer Versuchsdauer zeigte die Gärintensität des *Jensen*-Sarkoms in Ca-Ringerl.$_1$ und Ca-Ringerl.$_2$ eine besondere starke Abnahme, die zu einer beträchtlichen Verminderung des Gäranstiegs (gegenüber den Parallelversuchen mit nachträglichem Ca-Zusatz) führte[3]. Daß dieser Abfall beim *Flexner-Jobling*-Carcinom nicht so stark war, kann vielleicht dahin gedeutet werden, daß die dichtende Wirkung des Calciums bei diesem Tumor größer als beim *Jensen*-Sarkom ist. Ein besonderes Interesse beansprucht in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß die Gärintensität in Ca-Ringerl.$_2$ nicht größer ist als in Ca-Ringerl.$_1$. Der Befund spricht dafür, daß die angenommene Permeabilitätsverminderung bereits bei einer $CaCl_2$-Konzentration von $< 0{,}0018$ Mol/Liter maximal ist.

Bis zu einem gewissen Grade kann das Calcium in seinem Einfluß auf die Gärung durch Magnesium ersetzt werden. Gleich dem Calcium ist das Magnesium bei unmittelbarer Wirkung imstande, das Gärvermögen zu steigern. Die Förderung ist nur schwächer, viel unregelmäßiger und erreicht durchschnittlich bei einer höheren Konzentration ihren größten Wert. Ferner ist das Magnesium gleich dem Calcium außerstande, die Gärung bei nachträglichem Zusatz zum Medium zu steigern. Es liegt daher nahe, für beide (zweiwertigen) Kationen den gleichen Wir-

[1] Die Vorbereitungszeit (= Zeit von der Entfernung des Tumors aus dem Tierkörper bis zum Beginn der Messungen) bewegte sich bei der Mehrzahl der vorliegenden Versuche (ebenso wie bei den früher mitgeteilten Untersuchungen über die Wirkung des Kaliums) etwa zwischen 2 und $2^1/_2$ Stunden. Die vorhandenen Unterschiede sind daher zu gering, um einen deutlichen Einfluß der Vorbereitungszeit erkennen zu lassen, selbst bei Parallelversuchen am gleichen Tumor. Aus diesem Grunde wurden diesbezügliche Angaben in den Tabellen unterlassen. — [2] *A. Lasnitzki*, l. c. — [3] Die entsprechenden Versuche mit K-Ringerl. zeigten auch hier einen geringeren Abfall der Gärintensität. Daß in K-Ringerl. (und in Ringerl.) überhaupt eine Abnahme des Gärvermögens im Laufe des Versuchs eintritt, könnte — abgesehen von der Senkung der Glucose- und Bicarbonatkonzentration — damit zusammenhängen, daß die Abdiffusion des Kaliums bei Beginn der Messungen doch noch nicht ganz beendet ist, bzw. damit, daß im überlebenden Gewebe beständig indiffusibles Kalium in diffusibles übergeht.

kungsmechanismus anzunehmen. Danach sollte das Magnesium ähnlich wie das Calcium die Abdiffusion des Kaliums aus dem Zellinnern hemmen; nur dürfte die Permeabilitätsverminderung schwächer und ihr Zustandekommen unsicherer sein. Aus diesen Gründen schien es auch kaum aussichtsvoll, den Einfluß des Magnesiums auf den Kaliumgehalt des Tumorgewebes zu untersuchen und damit zu entscheiden, ob unsere Vorstellung richtig ist.

Zusammenfassung.

1. Ebenso wie das Kalium ist auch das Calcium bei unmittelbarer Einwirkung imstande, das Gärvermögen der Tumorzelle (*Jensen*-Sarkom, *Flexner-Jobling*-Carcinom) zu steigern. Dies gilt zunächst für den schon früher behandelten Fall, daß das Medium Kalium enthält. Es gilt aber auch, wie hier gezeigt wird, für das kaliumfreie Medium. Die beiden geprüften $CaCl_2$-Konzentrationen, 0,0018 und 0,0036 Mol pro Liter, unterscheiden sich dabei nicht wesentlich in ihrer Wirkung. Während jedoch das Kalium auch bei nachträglichem Zusatz zum kalium- und calciumfreien Medium die Gärung fördert, übt das Calcium unter dieser Bedingung keinen Einfluß aus.

2. Prinzipiell ebenso wie Calcium verhält sich Magnesium (Untersuchung am *Jensen*-Sarkom). Die Wirkung des Magnesiums ist nur schwächer, unsicherer und erreicht ihr Maximum durchschnittlich bei einer höheren Konzentration (etwa 0,0036 Mol/Liter $MgCl_2$).

3. Es wird eine Theorie aufgestellt, zufolge der die unmittelbar gärungsfördernde Wirkung des Calciums dadurch zustandekommt, daß es die Abdiffusion des Kaliums aus der Tumorzelle hemmt. Damit wird die Vorstellung verbunden, daß eine Abdiffusion des Kaliums nicht nur im kaliumfreien Medium erfolgt, sondern auch — in einem geringeren Grade — im kaliumhaltigen Medium (etwa mit dem K-Gehalt des Blutplasmas). Für das Magnesium wird ein ähnlicher Wirkungsmechanismus angenommen.

Einfluß von ein- und mehrwertigen Alkoholen, sowie von Mono- und Polysacchariden auf die Flüssigkeitsaufnahme durch Gele.

Von

L. I. Weber und **Fritz Lederer.**

(Eingegangen am 22. Februar 1936.)

Einleitung.

Die Quellungserscheinungen an organischen Gelen wurden im Hinblick auf ihre biologische Bedeutung schon vielfach untersucht.

Kochmann[1] hat an Fibrinflocken und quergestreiftem Muskel den Einfluß der Narkotica der Fettreihe auf die Wasserquellung beobachtet. Er fand bei den ersten fünf Alkoholen eine steigende, quellungshemmende Wirkung und kam zu der Anschauung, die Dehydratation der Kolloide und die durch sie bedingte Permeabilitätsverminderung als Ursache der Narkose anzusprechen, allerdings mit der Einschränkung, daß die Narkose als ein zusammengesetzter Vorgang noch von einer Reihe anderer Bedingungen abhängig ist. *Dette*[2] hat diese Anschauung durch eine Reihe weiterer Versuche über die entquellende Wirkung der Narkotica auf die Zellkolloide gestützt. Von *Otto v. Fürth*[3] stammt eine Quellungstheorie der Muskelkontraktion. *Lottermoser* und *Tacheci*[4] haben die Einwirkung von Säuren auf Hautpulver und die Abhängigkeit der Säureaufnahme vom Quellungsgrad studiert. Aus letzter Zeit liegt eine Arbeit von *Ph. Bamberger*[5] über den Einfluß von Zell-Lipoiden auf die Quellung von Gelatine vor, in welcher betont wird, daß man nicht nur die Menge des von der Gelatine gebundenen Wassers, sondern auch die Art der Wasserbindung berücksichtigen müsse. Der Einfluß der Zusätze äußert sich nicht nur in bezug auf die Gesamtmenge des aufgenommenen Wassers, sondern auch auf das Verhältnis von ausfrierbarem zu durch physikalische Methoden nicht mehr entfernbarem Wasser.

Daß viele derartige Arbeiten bisher nur Teilergebnisse brachten, liegt an der Vielheit und Verschiedenartigkeit der Vorgänge, welche die Quellung hervorrufen[6]. So wird z. B. die Säurequellung von Gelatine durch Harnstoff deutlich begünstigt, während dieser nach *M. H. Fischer*[7] auf die Quellung von Fibrin ohne Einfluß sein soll. Die Quellung der Gelatine in wässerigen Lösungen von etwa 50 organischen Säuren wurde von *A. Kuhn*[8] untersucht. Er fand bei allen leicht löslichen Säuren bei mittlerer Konzentration ein Quellungsmaximum. Die Quellung deutete er als das Resultat von drei gleichzeitig verlaufenden Vorgängen, der eigentlichen Quellung (Hydratation), der Solbildung und Hydrolyse, der Dehydratation oder Flockung, und definierte als Quellungsmaximum den Punkt, an dem die mit steigender

[1] Diese Zeitschr. **136**, 49, 1923. — [2] Ebenda **149**, 136, 1924. — [3] Ergebn. d. Physiol. **17**, 363, 1919; s. auch *O. Meyerhof*, „Die chemischen Vorgänge im Muskel", S. 296ff., Berlin 1930. — [4] Kolloidzeitschr. **57**, 56, 1931. — [5] Diese Zeitschr. **266**, 175, 1933. — [6] Vgl. *H. Freundlich*, Kapillarchemie **2**, 562ff, Leipzig 1932. — [7] Das Ödem, S. 29ff., Dresden 1910. — [8] Kolloidchem. Beih. **14**, 147.

Konzentration zunehmende Quellung von der Solbildung und der Hydrolyse überwunden wird.

Eine zusammenfassende Arbeit über die Quellung der Gelatine in wässerigen Lösungen von Säuren, Basen, Salzen und deren Gemischen stammt von *A. Küntzel*[1]. *K. Rudsit*[2] hat an einem großen experimentellen Material versucht, allgemeine Gesetzmäßigkeiten der Gelatinequellung in Elektrolytlösungen abzuleiten. *Wo. Ostwald*, *A. Kuhn* und *E. Böhm*[3] haben die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Quellung der Gelatine untersucht. *Tomita*[4], *v. Kuthy*[5] und *Jumikura*[6] haben sich bemüht, die Beziehungen zur Oberflächenaktivität aufzuklären.

Die Untersuchung der biologisch so wichtigen hydroxylhaltigen Stoffe, die den Gegenstand dieser Arbeit bilden, wurde unter möglichst konstanten und vergleichbaren Bedingungen vorgenommen. Die Wahl von 17 Stoffen, welche sich untereinander sowohl im Molekulargewicht als auch in bezug auf die Anzahl der im Molekül vorhandenen OH-Gruppen stark unterscheiden, sollte einen Einblick in die Wirkungsweise dieser Stoffe — vom einfachen Methylalkohol bis zu den komplizierten Polysacchariden, Stärke und Dextrin — gestatten.

Versuchsanordnung.

100 ccm einer bei etwa 50° C bereiteten 5%igen Gelatinelösung wurden in Schalen von 12 cm Durchmesser gegossen. Nach 2 Stunden wurde die erstarrte Gallerte mit 50 ccm der entsprechenden Flüssigkeit überschichtet und die mit Glasplatten bedeckten Schalen auf einer Temperatur von 18° (± 1°) gehalten. Nach bestimmten Zeiten wurde das Volumen der über dem Gel stehenden Flüssigkeit durch Umgießen in kleine graduierte Meßzylinder gemessen. Durch Vergleich der Volumina der überschichteten Lösungen mit dem Volumen des im Parallelversuch unter den gleichen Bedingungen überschichteten destillierten Wassers konnte festgestellt werden, ob die Stoffe, die sich in der überschichteten Flüssigkeit befinden, dem Gel Flüssigkeit entziehen, d. h. entquellend wirken, oder ob eine Flüssigkeitsaufnahme durch das Gel erfolgt ist. Das Gel wurde aus *Kahlbaum*-Golddruckgelatine hergestellt. Die als Zusatz dienenden Stoffe wurden als „reinst" bezogen und, soweit notwendig, umkristallisiert bzw. rektifiziert.

In den Tabellen sind in der ersten Spalte die Zeiten angegeben, nach denen die Messungen vorgenommen wurden. In den nächsten Spalten befinden sich die tatsächlich gemessenen Flüssigkeitsvolumina in ccm. Da sämtliche Gele mit je 50 ccm überschichtet wurden, zeigen Zahlen unter 50 eine Flüssigkeitsaufnahme durch das Gel, also eine Quellung an, während Zahlen über 50 eine Flüssigkeitsabgabe, d. h. eine Entquellung des Gels bedeuten.

Verhalten von Gelatinegelen gegenüber Lösungen.

a) Einwertige aliphatische Alkohole.

In Tabelle I sind die Ergebnisse der Einwirkung wässeriger *Methylalkohollösungen* verschiedener Konzentrationen auf das Gel dargestellt. Es zeigt sich, daß Lösungen geringer Konzentration zwar noch

[1] Diese Zeitschr. **209**, 326, 1929. — [2] Kolloidzeitschr. **53**, 205. — [3] Kolloidchem. Beih. **20**, 412. — [4] Diese Zeitschr. **153**, 335, 1924. — [5] Ebenda **244**, 319, 1932. — [6] Ebenda **157**, 377, 1925.

eine quellende Wirkung haben, jedoch eine wesentlich geringere als diejenige des reinen Wassers. Lösungen mittlerer Konzentration führen schnell zu einem Maximum der Entquellung, folgen dann aber, wohl wegen ihrer inzwischen erfolgten Verdünnung, dem Verhalten stark verdünnter Lösungen. Hochkonzentrierte Lösungen erreichen später das Maximum der Entquellung. Reiner Methylalkohol wirkt bereits so energisch entquellend, daß er eine stark flockende Wirkung auf das Gel ausübt, die im Versuch durch die sofortige Trübung der Geloberfläche, die langsam in die Tiefe fortschreitet, zu erkennen ist.

Tabelle I. Methylalkohol.

Zeit Std.	H_2O	1 mol.	4 mol.	8 mol.	15,6 mol. = 50 %	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
1	48,6	49,0	50,1	51,9	53,0	51,3
2	47,9	48,1	49,1	52,1	53,2	51,0
21	44,0	45,0	48,0	51,0	55,2	53,0
48	41,0	42,0	44,0	48,0	54,0	52,0
85	37,8	39,0	40,0	44,5	49,0	49,8

Tabelle II gibt die Quellung des Gelatinegels durch verschieden konzentrierte Lösungen von *Äthylalkohol* wieder. Es zeigte sich, daß auch hier schwache Konzentrationen im Vergleich zu Wasser die Quellung hemmen, stärkere Konzentrationen bis zur Erreichung eines Maximums entquellend wirken. Je höher die Konzentration der Lösung ist, umso später wird dieses Maximum erreicht. Die stärkste Wirkung übt der Alkohol in absolutem Zustand aus. Hier tritt infolge der sehr stark flockenden Wirkung eine wesentliche Veränderung der Gelstruktur ein. Im Vergleich zum Methylalkohol hemmt der Äthylalkohol die Wasserquellung bedeutend stärker.

Tabelle II. Äthylalkohol.

Zeit Std.	1 mol.	4 mol.	8 mol.	50 %	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
1	49,6	51,3	54,1	55,0	64,3
2	49,0	51,8	55,2	56,9	66,8
21	46,1	50,0	60,5	62,0	66,7
48	44,0	46,0	58,0	60,0	67,7
85	40,0	43,0	53,0	58,0	68,0

Besonders deutlich wird diese stärkere Entquellung beim Vergleich der reinen Alkohole.

Aus Tabelle III ist ersichtlich, daß der *Propylalkohol* eine stärker entquellende Wirkung ausübt als der Methylalkohol und der Äthylalkohol.

Tabelle III. Propylalkohol.

Zeit Std.	1 mol.	4 mol.	8 mol. = 50 %	100 %	Zeit Std.	1 mol.	4 mol.	8 mol. = 50 %	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	45,5	58,0	60,2	69,0
1	49,3	52,0	53,2	55,2	48	41,0	53,0	59,1	72,8
2	49,0	52,2	54,5	59,0	85	38,0	43,5	56,0	71,0

Da der Einfluß der Alkohole, wie aus diesen Versuchen hervorgeht, sich meist erst bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen bemerkbar macht, konnte bei dem nur halbmolar löslichen *Butylalkohol* (Tabelle IV) oder gar bei dem nur viertelmolar wasserlöslichen Isoamylalkohol (Tabelle V) keine sehr große Wirkung erwartet werden. Immerhin ist deutlich zu erkennen, daß sie auch in diesen sehr verdünnten Lösungen eine geringere Gelatinequellung verursachen als reines Wasser, also entquellend wirken. In wasserfreiem Zustand diffundieren diese stark oberflächenaktiven Alkohole selbst, allerdings nur wenig, in das Gel hinein.

Tabelle IV. Butylalkohol.

Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.	100 %	Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.	100 %
0	50,0	50,0	50,0	21	45,0	46,0	50,0
1	49,0	49,5	50,0	48	42,0	43,0	48,0
2	48,0	48,5	50,0	85	40,0	40,5	46,0

Tabelle V. Amylalkohol.

Zeit Std.	1/4 mol.	100 %	Zeit Std.	1/4 mol.	100 %	Zeit Std.	1/4 mol.	100 %
0	50,0	50,0	2	47,3	49,0	48	41,0	47,0
1	48,5	50,0	21	44,0	48,5	85	38,0	46,5

Es liegt die Vermutung nahe, daß die relativ geringe entquellende Wirkung dieser beiden Alkohole im Vergleich zu der Wirkung von Propylalkohollösungen derselben Konzentration mit ihrer geringen Wasserlöslichkeit zusammenhängt. Daraus darf aber nicht der Schluß gezogen werden, daß die Löslichkeit eines Stoffes für seine entquellende Wirkung maßgebend ist. Wie das Beispiel der ersten drei Alkohole zeigt, können mit Wasser völlig mischbare Flüssigkeiten, welche also eine für Wasser unendliche Lösungskapazität besitzen, auch sehr verschieden wasserentziehend bzw. entquellend wirken.

b) Glykole.

Äthylenglykol, Trimethylenglykol und β-Butylenglykol wurden in wässerigen Lösungen verschiedener Konzentration auf ihre entquellende Wirkung untersucht (Tabellen VI, VII und VIII). Es ergab sich wiederum, daß kleine Konzentrationen die Quellung durch das Wasser nur hemmen, größere die Wasserquellung unterbinden und einen mit der

Konzentration steigenden, entquellenden Einfluß ausüben. Der Vergleich der 100 %igen Glykole, der 4 mol. und der 50 %igen Lösungen zeigt, daß die entquellende Wirkung vom Äthylenglykol zum Trimethylenglykol um nahezu denselben Betrag steigt, wie vom Trimethylenglykol zum Butylenglykol. Wir finden also in der homologen Reihe der Glykole dieselben Gesetzmäßigkeiten wie bei den einwertigen Alkoholen.

Tabelle VI. Äthylenglykol.

Zeit Std.	1 mol.	10 %	4 mol.	8 mol. = 50 %	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
1	49,0	50,0	52,0	56,0	62,0
2	48,0	49,0	53,0	57,2	67,5
21	46,0	47,0	53,0	59,0	76,5
48	42,0	44,0	50,0	56,5	73,0

Tabelle VII. Trimethylenglykol.

Zeit Std.	1 mol.	4 mol.	50 %	100 %	Zeit Std.	1 mol.	4 mol.	50 %	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	47,0	55,5	62,0	86,0
1	49,0	52,5	56,0	65,0	48	43,0	52,0	58,5	83,0
2	48,0	53,2	58,0	71,0	72	40,0	49,0	53,0	79,0

Tabelle VIII. β-Butylenglykol.

Zeit Std.	1 mol.	4 mol.	50 %	8 mol.	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
1	51,0	56,0	59,0	63,0	68,0
2	50,5	59,0	63,5	69,0	75,5
21	49,0	65,0	72,8	86,5	98,0
48	46,0	62,0	69,0	84,5	96,0
72	41,0	58,0	65,0	82,0	94,0

c) Äthylenglykol, Glycerin, Erythrit, Mannit.

Die Daten für Äthylenglykol sind schon in Tabelle VI enthalten. Tabelle IX bis XI geben die Daten für Glycerin, Erythrit und Mannit wieder. Auch hier ergibt sich rein qualitativ die Feststellung, daß höhere Glieder der homologen Reihe eine stärkere Entquellung hervorrufen.

Tabelle IX. Glycerin.

Zeit Std.	1 mol.	10 %	4 mol.	8 mol.	50 %	100 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
1	49,2	50,0	54,0	59,5	66,0	66,5
2	49,0	50,0	59,8	62,5	58,0	74,5
21	47,0	47,0	56,0	69,5	60,0	89,0
48	44,5	44,5	53,0	67,0	57,3	87,0
85	40,8	41,0	48,0	61,5	52,0	82,8

Tabelle X. Erythrit.

Zeit Std.	1/2 mol.	10 %	1 mol.	4 mol.	Zeit Std.	1/2 mol.	10 %	1 mol.	4 mol.
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	46,5	47,0	48,0	61,0
1	50,0	50,0	51,0	59,0	48	44,0	44,0	44,0	63,6
2	49,5	49,5	50,0	61,0	85	39,0	40,0	39,0	56,0

Tabelle XI. Mannit.

Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.	10 %	15 %	Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.	10 %	15 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	45,0	47,0	48,0	50,2
1	49,0	50,0	50,5	51,0	48	42,0	44,0	45,8	48,0
2	48,0	50,0	50,0	51,0	85	31,0	32,0	42,0	42,0

d) Mono- und Disaccharide.

Die Entquellung durch verschieden konzentrierte Lösungen von Glucose, Saccharose, Maltose und Lactose ist in den Tabellen XII bis XV wiedergegeben. Es zeigt sich eine vollkommene Übereinstimmung der entquellenden Eigenschaften von Saccharose und Maltose. Ein Vergleich mit Lactose ist infolge ihrer geringen Löslichkeit nur in halbmolarer Konzentration möglich. Die etwas stärkere entquellende Wirkung der Lactose kann dahin gedeutet werden, daß die ursprünglich in der Wärme bereitete halbmolare Lösung bei der Versuchstemperatur in schwach übersättigtem Zustand war und sich durch Wasseraufnahme aus dem Gel zu einer gesättigten Lösung verdünnte. Die drei untersuchten Disaccharide wirken jedenfalls stärker entquellend als das Monosaccharid Glucose.

Tabelle XII. Glucose.

Zeit Std.	1/2 mol.	1 mol.	2 mol.	50 %	Zeit Std.	1/2 mol.	1 mol.	2 mol.	50 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	47,0	52,0	65,0	70,0
1	49,5	52,0	56,0	59,0	48	44,2	48,5	62,0	65,0
2	49,0	52,0	58,5	62,0	72	37,0	42,0	56,0	57,0

Tabelle XIII. Saccharose.

Zeit Std.	1/2 mol.	1 mol.	50 %	2 mol.	Zeit Std.	1/2 mol.	1 mol.	50 %	2 mol.
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	51,0	61,0	71,5	83,0
1	51,0	54,5	58,0	62,0	48	48,0	58,0	68,5	78,5
2	50,3	55,5	61,0	67,0	72	39,0	50,0	62,0	71,0

Tabelle XIV. Maltose.

Zeit Std.	1/2 mol.	1 mol.	50 %	2 mol.	Zeit Std.	1/2 mol.	1 mol.	50 %	2 mol.
0	50,0	50,0	50,0	50,0	21	51,0	62,0	72,0	83,0
1	51,0	54,5	57.5	62,0	48	48,5	59,0	70,0	78,5
2	50,5	55,8	60,5	67,0	72	42,5	52,0	64,0	72,0

Tabelle XV. Lactose.

Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.	Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.	Zeit Std.	1/4 mol.	1/2 mol.
0	50,0	50,0	2	48,0	52,0	48	44,0	51,5
1	49,0	52,0	21	47,0	54,0	72	40,0	47,0

e) Stärke und Dextrin.

Das Gel wurde mit verschieden konzentrierten Lösungen von käuflichem ungereinigtem Dextrin und ebensolcher Kartoffelstärke überschichtet. Aus diesen nur qualitativ zu wertenden Versuchen (Tabelle XVI) ergab sich, daß gleichprozentige Lösungen von Dextrin und Stärke den gleichen Einfluß auf die Quellung ausüben. Von einer Konzentration von 5 % an tritt eine völlige Unterbindung der Wasserquellung ein, die mit steigender Konzentration zu einer starken Entquellung führt. Sole niedrigerer Konzentration vermögen nur die Wasserquellung zu hemmen.

Tabelle XVI.

Zeit Std.	Dextrin				Stärke	
	1 %	5 %	10 %	25 %	1 %	5 %
0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
1	48,3	49,5	51,0	52,0	48,0	50,0
2	48,0	50,0	52,0	55,0	47,0	50,0
21	45,5	50,0	57,0	69,0	45,0	50,0
48	43,6	50,0	58,8	72,0	44,0	51,0
85	41,2	44,2	57,7	78,0	40,2	50,2

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Aus den Versuchen kann außer der Beobachtung, daß die Entquellungswirkung in einer homologen Reihe mit jeder CH_2-Gruppe steigt, auch die weitere Erkenntnis gewonnen werden, daß hydroxylhaltige Stoffe mit steigender Anzahl von OH-Gruppen bzw. mit steigendem Molekulargewicht eine wachsende wasserentziehende Wirkung auf das Gel ausüben. Aus beiden Beobachtungsgruppen folgt die dritte Feststellung, daß die Löslichkeit für die entquellende Wirkung eines Stoffes nicht ausschlaggebend ist. Zwar ist es nach der angewandten Versuchsmethode recht schwierig, die Wirkung sehr verdünnter Lösungen, also auch sehr

schwer löslicher Stoffe, zu erfassen. Es ist aber doch eindeutig, daß z. B. die beschränkt löslichen Stoffe Dextrin und Erythrit stärker quellungshemmend wirken, als der mit Wasser mischbare Äthylalkohol. Andererseits wirken die drei mit Wasser mischbaren Alkohole und die drei ebenfalls mit Wasser mischbaren Glykole sowie das Glycerin so verschieden stark auf die Wasserquellung des Gelatinegels, daß von einer maßgeblichen Bedeutung der Löslichkeit nicht die Rede sein kann.

Man darf vermuten, daß hier ein anderer Faktor, nämlich die Lösungsintensität, eine wesentliche Rolle spielt. In dieser Richtung verdient die Tatsache hervorgehoben zu werden, daß sowohl 5%ige Dextrinlösungen, als auch 5%ige Stärkelösungen sich gerade im Quellungsgleichgewicht mit dem 5%igen Gelatinegel befinden, so daß sie, über dieses geschichtet, innerhalb 24 Stunden weder Quellungs- noch Entquellungserscheinungen hervorrufen. Dies ist insofern einer genaueren quantitativen Untersuchung wert, als es sich hier um drei verschiedene lyophile Kolloide handelt, die z. B. nach der Goldzahlmethode eine verschiedene Lyophilie besitzen, sich aber nach der hier angewandten Methode als gleich hydrophil erwiesen haben.

Zusammenfassung.

1. Durch Überschichtung von Gelatinegelen mit Wasser oder wässerigen Lösungen von Nichtelektrolyten wurde in Reihenversuchen die Wirkung der Nichtelektrolyte auf die Quellung untersucht.

2. Einwertige Alkohole wirken entquellend und zwar in der Reihenfolge Methylalkohol < Äthylalkohol < Propylalkohol.

3. Glykole wirken stärker entquellend als die einwertigen Alkohole. Innerhalb der Reihe Äthylenglykol, Trimethylenglykol, β-Butylenglykol steigt wie bei den einwertigen Alkoholen die wasserentziehende Wirkung mit zunehmender Kettenlänge des Moleküls. — Mit reinem β-Butylenglykol wurde die stärkste im Laufe der Untersuchungen überhaupt erzielte Entquellungswirkung erreicht.

4. In der Reihe Glykol, Glycerin, Erythrit, Mannit, bei dem Monosaccharid Glucose und den Disacchariden Maltose, Saccharose und Lactose kann deutlich festgestellt werden, daß mit zunehmender Anzahl der OH-Gruppen und mit steigendem Molekulargewicht auch die wasserentziehende Wirkung relativ größer wird.

5. Auch die Polysaccharide Dextrin und Stärke wirken stark entquellend, und zwar beide in gleichem Maße.

6. Die Löslichkeit eines Stoffes ist zwar von Bedeutung für seine Wirkung auf den Quellungszustand des Gelatinegels, aber keinesfalls maßgebend für seine Wirkungsstärke.

Bemerkung zur Arbeit „Franz Földes: Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin“[1].

Von

Regine Kapeller-Adler.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 25. Januar 1936.)

In dieser eben erschienenen Veröffentlichung gibt der Verfasser neben einer Modifikation der *Knoop-Voge*schen Reaktion und der von mir angegebenen Methode zum Nachweis des Histidins im Schwangerenharn selbst eine „neue Histidinprobe“ für den Harn an.

Hierzu muß folgendes bemerkt werden: Wie der Autor selbst hervorhebt, wird die von ihm angeführte *neue Histidinreaktion weder von reinen Histidinlösungen noch von mit Histidin versetzten Urinproben* gegeben. Es erscheint demnach merkwürdig, daß Herr *Földes* trotzdem diese Reaktion als einen neuen Histidinnachweis für den Harn bezeichnet, da man doch im allgemeinen erst dann imstande ist, einen Stoff mittels einer neuen Reaktion im Harn einwandfrei nachzuweisen, wenn man sich vorher davon überzeugen konnte, daß reine Lösungen des fraglichen Stoffes die Reaktion in spezifischer Weise geben. Nichtsdestoweniger setzt der Autor seine neue Reaktion mit meiner, durch quantitative Bestimmungen an reinen Histidinlösungen vielfach erprobten und mit Analysen an einigen Hunderten Harnen belegten Methode zum Histidinnachweis in Parallele und hält sein Verfahren sogar für empfindlicher.

Es darf vielleicht darauf hingewiesen werden, daß die vom Autor angegebene neue Histidinreaktion, welche darauf beruht, daß Harn nach Zusatz von Brom in essigsaurer Lösung in der *Kälte* eine orangegelbe bis orangerote Färbung liefert, von *jedem normalen sowie pathologischen* Harn in größerem oder geringerem Maße gegeben wird und *normale Harnfarbstoffe* anzeigen dürfte. Bekanntlich sind im Harn eine ganze Reihe farbloser Substanzen enthalten, die durch Oxydation in saurer Lösung (in diesem Falle Brom in essigsaurer Lösung) in Farbstoffe übergehen können[2]. Diese von mir gelegentlich der Untersuchung unzähliger Harne auf Histidin lange vor dem Erscheinen der Arbeit von *Földes* in jedem Urin beobachtete orangerote Färbung macht einer schwach zitronengelben Platz, sobald der Harn mit Brom *gesättigt* ist, welch letzterer Umstand neben dem Erhitzen für das Zustandekommen der Histidinreaktion unbedingt erforderlich ist[3]. Und gerade die Sättigung des Harns mit Brom und die Verwendung höherer Temperaturen werden von Herrn *Földes* bei seiner neuen Histidinreaktion vermieden.

Mittels dieses neuen Verfahrens hat demnach der Autor sicherlich Histidin nicht erfaßt.

Die *Knoop-Voge*sche Reaktion[4] zum Nachweis des Histidins besteht darin, daß Harn *nach Sättigen mit sehr verdünntem Bromwasser erhitzt wird*, wobei eine rasch abblassende rote Färbung gebildet wird. Diese Methode

[1] Diese Zeitschr. **283**, 199, 1936. — [2] *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handb. d. physiol. u. path.-chem. Analyse, Berlin, Springer, 1924, S. 432. — [3] Vgl. auch *Knoop*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. **11**, 356, 1908. — [4] Brit. med. J. **2**, 829, 1929; Proc. roy. Soc. med. **32**, 638, 1930.

modifizierte der Autor dahin, daß er den Harn mit einer zur *Sättigung ungenügenden Menge Brom-Essigsäurelösung* schüttelt und daß zum Zustandekommen der Histidinreaktion *notwendige Erhitzen durch vorsichtiges Erwärmen ersetzt*. Dadurch entgeht ihm eventuell vorhandenes Histidin und er erfaßt wie bei seinem eigenen neuen Verfahren wieder nur normale Harnfarbstoffe.

Zu der vom Autor durchgeführten Abänderung meiner Methode zum Nachweis des Histidins im Gravidenharn sei folgendes hervorgehoben. Das von mir angegebene Verfahren[1] besteht darin, daß der zu prüfende Harn *tropfenweise unter ständigem Umschütteln* mit einer 1%igen Bromlösung in Essigsäure bis zur zitronengelben Färbung (Bromsättigung) versetzt wird, wobei man sich durch Tüpfeln auf Jodkalistärkepapier davon überzeugt, daß die Lösung nur einen leisen Überschuß an Brom enthält. Nach Ablauf einer unbedingt erforderlichen Reaktionszeit von etwa 10 Minuten werden 2 bis 3 ccm Ammoniak-Ammoncarbonatreagens zugesetzt und die Lösung für einige Minuten in ein Becherglas mit kochendem Wasser gebracht[2]. Gravidenharne, welche durchweg histidinhaltig sind, färben sich hierbei rot bis rotviolett, histidinfreie Harne gelb bis hellbraun. Mittels dieser Reaktion habe ich rund 600 Harne Gravider und Nichtgravider untersucht mit einem Fehler von 3 bis 4%.

Das Wesentliche dieser Reaktion besteht darin, daß das Histidin nur *langsam, schrittweise* mit dem Bromreagens gesättigt wird. Setzt man nämlich einer reinen Histidinlösung eine an und für sich kleine Menge Bromlösung nicht tropfenweise, sondern auf einmal hinzu, so ergeben sich, wie ich durch quantitative Untersuchungen feststellen konnte, bedeutende Histidinverluste. Das Histidin ist nämlich gegen *größere Brommenger* schon in der *Kälte* sehr empfindlich und nicht, wie der Autor annimmt, erst in der Hitze. Deswegen muß die von Herrn *Földes* an meiner Histidinreaktion durchgeführte Modifikation, die darin besteht, daß der Autor in zahlreichen Vorproben die zur Sättigung des Harns nötige Brommenge zunächst ermittelt und diese Menge dann dem Harn auf einmal zusetzt, in histidinhaltigen Harnen unbedingt zu Fehlresultaten führen. Hierbei benutzt der Autor in Anlehnung an eine, am Wesen dieser Histidinreaktion ebenfalls vorbeigehende Arbeit von *M. Weiss*[3] nicht eine 1%ige, sondern eine $2^1/_2$%ige Bromlösung. Der übrige Teil des Verfahrens bleibt im wesentlichen unverändert. Es ist deswegen nicht zu verwundern, daß Herr *Földes* mittels dieser Modifikation, bei welcher das Histidin zerstört werden muß, bei der Untersuchung von Gravidenharnen durchaus schlechte Resultate erhalten hat.

Da mit der neuen Methode von *Földes* und seiner Modifikation der *Knoop-Voge*schen Reaktion Histidin überhaupt nicht zum Nachweis gelangt, mittels der *Földes*schen Modifikation meiner Methode Histidin nur ganz ausnahmsweise erfaßt werden kann, erübrigt sich eine Diskussion über die vom Autor angeführte Empfindlichkeit dieser Verfahren.

Die vom Autor auf Grund seiner Untersuchungen gezogenen Folgerungen über die Verwertbarkeit des Histidinnachweises im Harn für die Schwangerschaftsdiagnose erscheinen demnach keineswegs stichhaltig und müssen unbedingt abgelehnt werden.

---

[1] Klin. Wochenschr. **13**, 21, 1934. — [2] Übrigens setze ich in der letzten Zeit statt 2 bis 3 ccm nur *0,5 ccm Ammoniak-Ammoncarbonatlösung* hinzu und erhitze das Reaktionsgemisch genau eine *halbe Minute* im Becherglas mit *kochendem Wasser*. — [3] Klin. Wochenschr. **13**, 44, 1934.

Über die Bestimmung der Hydroxylzahl von Oxyfettsäuren.

Von

K. Hinsberg.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 25. Februar 1936.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Technik bedient sich seit langer Zeit als Charakteristikum für die Anzahl alkoholischer Hydroxylgruppen, die in Fettsäuren vorkommen, der sogenannten Acetylzahl bzw. Hydroxylzahl.

Erstere bezieht sich auf die Menge Kaliumhydroxyd zur Neutralisation der Essigsäure, die aus der vollständig acetylierten Substanz abgespalten werden kann, und letztere gibt an, wieviel Milligramm Kaliumhydroxyd erforderlich sind, um die Essigsäure zu binden, die nach dem Acetylieren aus 1 g Grundsubstanz gewonnen wird. Sie bezeichnen dem Grunde nach dasselbe, sie unterscheiden sich durch ihre Größe. So ist z. B. die Acetylzahl (AZ.) der Dioxystearinsäure 280,31, während die Hydroxylzahl (HZ.) 354,5 beträgt. Der Unterschied rührt daher, daß sich letztere auf die Dioxystearinsäure mit dem Molekulargewicht 316,29 bezieht, während sich die AZ. auf das Molekulargewicht des acetylierten Produktes der Diacetyldioxystearinsäure von 400,32 bezieht. Man kann folglich unter Zugrundelegung der entsprechenden Molekulargewichte die beiden Kennzahlen ineinander umrechnen.

Auch die Physiologie und Pathologie des Organismus kennt eine ganze Reihe von Oxysäuren, die rein aus physikalischen Gründen in zwei Gruppen, flüchtige und nichtflüchtige, getrennt werden können. Zur ersteren gehört z. B. Milchsäure, β-Oxybuttersäure und eine ganze Reihe von aromatischen Oxysäuren, die speziell im Darm entstehen; von den nichtflüchtigen sind bis jetzt als physiologische Bestandteile der Lipoide die Cerebron- und Oxynervonsäure bekanntgeworden, die beide in den Cerebrosiden durch *Klenk* aufgefunden worden sind. Sie haben beide 24 C-Atome und stehen der Lignocerinsäure und der Nervonsäure sehr nahe. Die anderen Lipoide, speziell Sphingomyelin, Lecithin, Kephalin, Cholesterinester und Fette enthalten nach unseren bisherigen Kenntnissen keine Oxyfettsäuren, obschon sie Säuren mit 18, 20 und 22 Kohlenstoffatomen enthalten, von denen man annehmen kann, daß sie durch β-Oxydation aus den Säuren mit 24 Kohlenstoffatomen hervorgegangen sind. Dabei müßten als Zwischenprodukte Oxysäuren auftreten, die, wenn auch nur in sehr geringen Mengen und präparativ nicht zugänglich, durch die Hydroxylzahl der gesamten Fettsäuren erkannt werden können. Weiter ist zu überlegen, daß wir gerade unter

den Fettsäuren mit 18 bis 22 C-Atomen solche mit mehrfachen Doppelbindungen antreffen, über deren Bildungsweise, Abbau und physiologische Bedeutung wir so gut wie nichts wissen. Es liegt aber nahe, als Arbeitshypothese anzunehmen, daß gerade die Doppelbindung, vielleicht in bevorzugtem Maße die mehrfache Doppelbindung, einen leichten Angriffspunkt für die Oxydationsfermente des Organismus bietet, und daß man hier durch Bestimmung der HZ. der Fette aus Organen Anhaltspunkte für den intermediären Stoffwechsel gewinnen kann.

Das Charakteristikum der HZ. wurde deshalb gewählt, weil die Bestimmung wesentlich einfacher als die der AZ. ist und doch dieselben Dienste leistet. Die von uns in dieser Richtung begonnenen Versuche wurden mit einer eigens für diesen Zweck modifizierten Methode ausgeführt, über die ich nachstehend berichte. Das Prinzip ist folgendes: Die Fettsäuren werden mit einer abgemessenen Menge Pyridin-Essigsäureanhydrid vollständig acetyliert und das Reaktionsprodukt auf ein bekanntes Volumen aufgefüllt. Hiervon kommt ein aliquoter Teil von z. B. 2 oder 3 ccm in einen Destillationsapparat, der nachstehend beschrieben ist, in welchem das überschüssige Essigsäureanhydrid und die gebildete Essigsäure im Vakuum bei Wasserbadtemperatur in eine vorgelegte Menge Kalilauge destilliert wird. Durch Bestimmung des Überschusses an Kalilauge läßt sich die Menge des destillierten bzw. verbrauchten Essigsäureanhydrids bestimmen und daraus die HZ. berechnen.

Für den Fall der Dioxystearinsäure ist die Reaktionsgleichung folgende:

$$\begin{array}{l} CH_3.(CH_2)_7.\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}.(CH_2)_7.COOH + 2(CH_3CO)_2O \\ \qquad = CH_3.(CH_2)_7.\underset{\displaystyle OOCCH_3}{\underset{|}{CH}}-\underset{\displaystyle OOCCH_3}{\underset{|}{CH}}.(CH_2)_7.COOH + 2CH_3COOH. \end{array}$$

Man sieht daraus, daß von den 2 Mol Essigsäureanhydrid bei der Acetylierung 2 Mol Essigsäure frei werden, während die 2 Mol Essigsäureanhydrid selbst mit Wasser bzw. Kalilauge unter Bildung von 4 Mol Essigsäure und Neutralisation der KOH reagieren würden. Es wird also für jedes Hydroxyl 1 Mol Essigsäure verbraucht, da die gebildete Diacetyldioxystearinsäure nicht flüchtig ist und infolgedessen nicht überdestilliert. Wesentlich für die Bestimmung ist, daß ein großer Überschuß von Essigsäureanhydrid vorhanden ist und daß die Acetylierung bis zum Ende durchgeführt wird. Wir verwenden deshalb eine fünffach normale Lösung von Essigsäureanhydrid in wasserfreiem Pyridin, benutzen als Vorlage eine genau abgemessene Menge von etwa 2,5 n KOH und titrieren den Überschuß an KOH mit einer genau n HCl zurück. Wir acetylieren in kleinen Meßkolben, die mit eingeschliffenem Steigrohr versehen sind, 5 bis 6 Stunden im Wasserbad bei 100° und verwenden bei 10 ccm Gesamtflüssigkeit etwa 0,5 g Fettsäuren.

Der Apparat, mit welchem wir die Bestimmung ausführen, ist in Abb. 1 dargestellt. Er wird vor Gebrauch mit Aceton ausgespült und im Brutschrank bei 60° vollständig getrocknet. Der Schliffstopfen trägt eine Bürette, in welche das Acetylierungsprodukt einpipettiert wird. In den Teil B

kommen z. B. 4,00 ccm etwa 2,5 n KOH, darauf wird der Hahnstopfen und Stopfen eingesetzt und der Apparat an der Wasserstrahlpumpe evakuiert (etwa 20 mm Hg). Jetzt pipettiert man in die Bürette des Schliffstopfens genau 2,0 ccm des Acetylierungsproduktes und läßt diese Menge durch den Hahn langsam nach Teil A fließen, wäscht die Bürette mit zweimal etwa $^1/_2$ ccm Pyridin nach, verteilt die Mischung gleichmäßig in Teil A und stellt darauf den ganzen Apparat in ein Doppelwasserbad, wie es in der Klin. Wochenschr. 1935, S. 792, beschrieben worden ist.

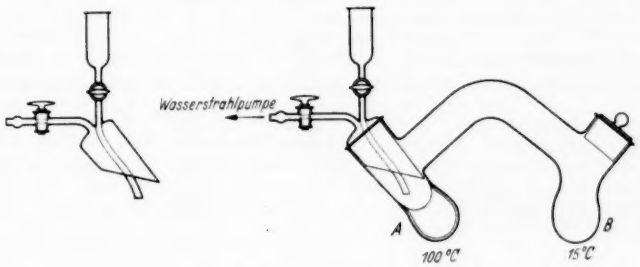


Abb. 1. Erläuterung im Text.

Dabei wird Teil A auf etwa 100° erhitzt, während Teil B im fließenden Wasser auf 15° abgekühlt wird. Innerhalb von 30 bis 40 Minuten, während welcher Zeit der Kolben hin und wieder geschüttelt wird, destilliert Essigsäureanhydrid und Essigsäure über und neutralisiert einen Teil der Kalilauge. Nach beendigter Destillation läßt man die Apparatur abkühlen, hebt das Vakuum auf und titriert den Überschuß an KOH mit n HCl zurück, unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator; dabei soll eine ganz leichte Rötung bestehen bleiben.

Man setzt eine Blindprobe an, indem man dieselbe Menge Essigsäureanhydrid-Pyridin unter denselben Umständen im Wasserbad erhitzt, mit Pyridin auffüllt und davon ebenfalls 2,0 ccm destilliert. Die Differenz zwischen den beiden Titrationsergebnissen gibt an, wieviel Essigsäure von dem alkoholischen Hydroxyl gebunden worden ist und gestattet die Berechnung der Hydroxylzahl.

Eingewogen 1,5952 g Dioxystearinsäure (Schmelzp. 129°) + 20 ccm 5 n Essigsäureanhydrid-Pyridingemisch (E.-PY.-G.) 7 Stunden im Wasserbad acetyliert und mit Pyridin auf 25 ccm aufgefüllt. Leerwert desgleichen.

Destillation 25 Minuten von 100° zu 18°.

Acetylprodukt	Etwa 2,5 n KOH ccm	Zurücktitriert n HCl ccm	Mittelwert	Differenz
2,00 ccm des Leerwertes	4,00	1,190		
		1,225		
		1,234		
		1,206	1,214	
2,00 ccm der Probe	4,00	2,010		
		2,020		
		2,015		
		2,120	2,041	0,827

Es wurden also verbraucht für 1,5952 g Dioxystearinsäure $\frac{0{,}827 \cdot 25}{2}$ ccm n HCl = ccm n KOH. 1 ccm n KOH = 56,12 mg KOH, mithin HZ. $= \frac{0{,}827 \cdot 25 \cdot 56{,}12}{2 \cdot 1{,}5952} = 364$, berechnet 354,5, Fehler + 2,8 %.

0,5967 g Dioxystearinsäure + 7,5 ccm E.-PY.-G. 5 Stunden bei 100° acetyliert, aufgefüllt auf 10 ccm, davon 2,00 bzw. 1,00 ccm 30 Minuten destilliert. Leerwert entsprechend.

Acetylprodukt	Etwa 2,5 n KOH ccm	n HCl ccm	HZ.	% Fehler
2,00 ccm des Leerwertes	4,00	0,720		
2,00 „ der Probe	4,00	1,442		
		0,722	344	— 3,06
1,00 ccm des Leerwertes	3,00	2,288		
1,00 „ der Probe	3,00	2,670		
		0,382	360	+ 1,53

Säuren, die keine alkoholischen Hydroxylgruppen enthalten, geben keine HZ., wie das folgende Beispiel mit der Stearinsäure zeigt.

Einwaage 1,1453 g Stearinsäure + 20 ccm 5 n E.-PY.-G. 6 Stunden acetyliert, aufgefüllt auf 25 ccm. Leerwert entsprechend.

Acetylprodukt	Etwa 2,5 n KOH ccm	n HCl ccm	Acetylprodukt	Etwa 2,5 n KOH ccm	n HCl ccm
4,00 ccm des Leerwertes	9,00 9,00	2,724 2,748 } 2,736	4,00 ccm der Probe	9,00 9,00	2,669 2,668 } 2,6685

Hydroxylzahl 0.

Eine Probe von 1,6043 g Linolsäure unter genau denselben Bedingungen acetyliert ergab eine HZ. von 2,21, wie aus untenstehendem Protokoll ersichtlich ist.

Acetylprodukt	Etwa 2,5 n KOH ccm	n HCl ccm
2,00 ccm des Leerwertes	5,00 5,00	2,415 2,445 } 2,430
2,00 ccm der Probe . . .	5,00 5,00	2,484 2,480 } 2,4805
		0,0505

Hydroxylzahl 2,21.

Eine Mischung von 0,82556 g Dioxystearinsäure mit 0,5234 g Stearinsäure gemischt unter denselben Bedingungen acetyliert, ergab auf Dioxystearinsäure berechnet eine HZ. von 359, Fehler + 1,3 %, wie die Analysendaten zeigen.

Acetylprodukt	Etwa 2,5 n KOH ccm	n HCl ccm		
2,50 ccm des Leerwertes	6,00	2,4708		
2,50 ccm der Probe . . .	6,00	2,970 3,092 2,940	3,000	0,5293

Hydroxydzahl 359. Fehler + 1,31 %.

Unsere Versuche, mit noch kleineren Mengen, d. h. mit etwa 0,3 g Substanz in 5 ccm Flüssigkeit zu arbeiten, führten bis jetzt zu keinem befriedigenden Resultat, aber bei 10 ccm Lösung und entsprechenden Fettsäurenmengen sind immer zuverlässige Werte zu erhalten.

Es versteht sich von selbst, daß die Apparatur peinlichst sauber zu halten, am besten mit Chromschwefelsäure zu reinigen ist, und daß auch die Schliffe hin und wieder auf ihre Dichtigkeit im Vakuum geprüft werden müssen. Über Versuchsergebnisse mit biologischem Material werden wir später berichten.

Über Melanogen und Melanin.

Von

H. K. Barrenscheen und **Herbert Prinz.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

Ausgeführt mit Unterstützung der „Ella Sachs-Plotz Foundation for the advancement of scientific investigation".

(Eingegangen am 27. Februar 1936.)

Einleitung.

Die Frage nach der Herkunft der melanotischen Pigmente kann heute wohl insofern als geklärt betrachtet werden, als man ganz allgemein in den zyklischen Bausteinen des Eiweißes, in erster Linie im Tyrosin und Tryptophan, die Muttersubstanzen der Melanine erblickt[1]. Über den Weg freilich, der zur Melaninbildung führt, kann Abschließendes bis heute noch nicht gesagt werden. Richtunggebend für unsere Auffassung über den Mechanismus der Melaninbildung sind in neuerer Zeit einmal die Arbeiten von *Bloch* (1) und seiner Schule, sowie die von *Schmalfuß* (2) geworden, welche in den Mittelpunkt der Betrachtung das Dioxyphenylalanin (Dopa) stellen und denen wir grundlegende Untersuchungen über die Verbreitung der Dopaoxydase in der belebten Natur und den Mechanismus der Pigmentbildung verdanken. Auf der anderen Seite sind hier die Untersuchungen von *Raper* (3—7) über die Tyrosinasewirkung zu nennen, die das Problem des Melanins bzw. des Melanogens weitgehend gefördert haben.

In der menschlichen Pathologie ist es zweifellos die Melanosarkomatose, bei der die oft ungeheure Bildung von Pigment und Pigmentvorstufen wohl eine der imponierendsten Leistungen des pathologischen Geschehens darstellt, die immer wieder zu der Erforschung und Verfolgung dieses für die gesamte Biologie so wichtigen Problems der Pigmentbildung anregt. Scheint doch gerade dieses von der Natur uns dargebotene Experiment wegen der enormen Masse von Pigment und Pigmentvorstufen am ehesten geeignet, uns einen Einblick in die Stoffwechselvorgänge bei der Pigmentbildung zu gewähren. Trotz dieser scheinbar günstigen Sachlage ist aber die Melanogen- und Melaninfrage gerade von dieser Seite her wenig geklärt worden. Das kristallisierte Melanogen von *Eppinger* (8), der als erster Beziehungen des Tryptophan-

[1] Eine zusammenfassende Darstellung über die ältere Literatur und die älteren Anschauungen gibt das Sammelreferat von *Fürth* (Zentralbl. f. allg. Pathol. u. patholog. Anat. **15**, 1904), dessen Schlußfolgerung auch heute noch im wesentlichen zu Recht besteht.

stoffwechsels zur Melanogenausscheidung im alimentären Belastungsversuch nachweisen konnte, ist wohl von *Feigl* und *Querner* (9) gleichfalls erhalten worden, doch scheint, abgesehen von der ungeklärten Konstitution, der Körper mit dem eigentlichen Melanogen, schon nach seiner Darstellung, wenig zu tun zu haben. Durch den Nachweis eines stickstofffreien Melanogens — wahrscheinlich Brenzkatechinessigsäure — durch *Thannhauser* und *Weiß* (10) ist das Problem insofern erweitert worden, als wir heute prinzipiell zwei Arten von Melanogenen auseinanderhalten müssen, die sich durch Löslichkeit und Gehalt bzw. Fehlen von Stickstoff und Schwefel unterscheiden. Damit taucht aber von neuem die Frage auf, ob wir in den Melaninen Körper sehen können, deren Bildung sich von einem einheitlichen Gesichtspunkt aus erklären läßt oder ob nicht vollkommen wesensverschiedene Prozesse schließlich zu dem uns als einheitlich scheinenden Endprodukt „Melanin" führen. Es ist das Verdienst von *Fürth* und *Kaunitz* (11), gerade diese Problematik in jüngster Zeit herausgearbeitet zu haben. Einen Beitrag dazu sollen auch nachstehende Untersuchungen liefern.

Eigene Untersuchungen.

In den Jahren 1929 bis 1935 hatten wir Gelegenheit, vier Fälle von Melanogenausscheidung bei Melanosarkomatose zu untersuchen. Teils handelte es sich um Material von lebenden Patienten, teils hatten wir Gelegenheit, Leichenharn und gleichzeitig bei der Obduktion gewonnenes Tumormaterial vergleichend zu untersuchen[1]. Dabei konnten wir die eingangs erwähnte prinzipielle Trennung der Melanogene in zwei Gruppen, *ätherlösliche-stickstofffreie*, *ätherunlösliche-stickstoff- und schwefelhaltige* Melanogene bestätigen. Wenn auch unsere Untersuchung chemisch nicht so weit vorgetragen werden konnten, daß eine eindeutige Klärung des Melanogen- bzw. Melaninproblems daraus resultiert, so möchten wir doch glauben, daß bei der Kompliziertheit der vorliegenden Verhältnisse jeder Vorstoß in dieser Richtung zu einem Fortschritt unserer Erkenntnis werden kann.

I. Aufarbeitung des Harns und Darstellung der Melanogene.

In sämtlichen von uns untersuchten vier Fällen war die Diagnose Melanosarkom bereits intra vitam gestellt und wurde autoptisch bestätigt. Durchwegs handelt es sich um primäre Tumoren des Auges, die trotz Exstirpation des Bulbus nach 3 bis 7 Jahren mit einer ausgedehnten Aussaat von Melanosarkomknoten rezidivierten. Der Harn unseres

[1] Für Überlassung des Materials sind wir weiland Prof. *Mattauschek*, Herrn Priv.-Doz. Dr. *Holler*, Herrn Dr. *Kaunitz*, sowie Herrn Professor *Priesel* zu großem Dank verpflichtet.

ersten Falles, gab starke Melanogenreaktion mit Ferrichlorid und Bromwasser, die *Thormählen*sche Reaktion war bis zum Schluß negativ. Analog den von *Thannhauser* und *Weiß* (10) beschriebenen Fällen ließ sich dieses Melanogen mit Äther ausschütteln. In den drei übrigen Fällen war in dem Harn neben der intensiven Melanogenreaktion mit *Ferrichlorid* und *Bromwasser* auch die *Thormählen*sche *Reaktion*, intensive Violettfärbung auf Zusatz von Nitroprussidnatrium und Kalilauge, die beim Übersäuern mit Eisessig in Blau umschlägt, ferner die Reaktion mit *Ehrlich*schem *Aldehydreagens* stark positiv. Äther und Essigester nahmen diese Melanogene nicht auf. Allen untersuchten Harnen gemeinsam war ein deutliches *Reduktionsvermögen gegen ammoniakalische Silberlösung* schon in der Kälte, sowie eine gegenüber dem normalen Harn auffallend starke *Reduktion von Ferrichlorid-Ferricyanid*, die zu einem massenhaften Ausfall von Berlinerblau führte. Als Leitreaktionen bei unserem Verfahren zur Isolierung des Melanogens dienten uns die Eisenchloridreaktion, die Reduktion von ammoniakalischer Silberlösung und Ferrichlorid-Ferricyanid. In den drei Fällen von ätherunlöslichem Melanogen auch die *Thormählen*sche und *Ehrlich*sche Aldehydreaktion.

Bei den vor Jahren begonnenen Untersuchungen über die Chromogene des Harns hatte sich uns bereits die Überzeugung aufgedrängt, daß eine Behandlung des Harns mit *Schwermetallsalzen*, wie sie in der älteren Literatur allgemein für die Isolierung der Melanogene herangezogen wurde, kaum zum Ziele führt. Bei der enormen Labilität und, dies gilt besonders für das stickstoffhaltige Melanogen, bei der *enormen Säureempfindlichkeit* dieser Körper mußte ein Weg gefunden werden, der möglichst unter Vermeidung oxydierend wirkender Salze und oxydationsbeschleunigender Säuren die Isolierung des Melanogens in halbwegs brauchbarer Form ermöglicht. Nach einer Reihe von Vorversuchen hat sich uns zum Schluß folgender Weg bewährt.

Der vom Sediment durch Zentrifugieren auf einer großen Zentrifuge befreite Harn wird in einer Apparatur, welche ein kontinuierliches Zutropfen der Flüssigkeit ermöglicht, im *Vakuum unter Stickstoffatmosphäre* bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur bis zur Sirupkonsistenz eingeengt, wobei auch zur Vermeidung von Luftoxydation der nachzusaugende Harn unter Stickstoffatmosphäre gehalten wird. Das namentlich bei größeren Harnmengen recht lästige Schäumen läßt sich nach unseren letzten Erfahrungen dadurch vermeiden, daß man den Harn vor dem Zentrifugieren *mit dem gleichen Volumen Alkohol fällt*. Mit einem Teil der Salze fallen dabei auch jene Körper aus, welche für das Schäumen und Stoßen verantwortlich sind. Der eventuell nach Alkoholvorbehandlung bis zur dünnen Sirupkonsistenz eingeengte Harn wird nun unter Stickstoff mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols gefällt und entweder unter Stickstoffatmosphäre von den ausgefallenen Salzen filtriert oder zentrifugiert. Geringe Mengen von Melanogen, welche der Niederschlag mechanisch zurückhält — weder das stickstofffreie noch das stickstoffhaltige Melanogen werden durch Alkohol gefällt — lassen sich mit kleinen Mengen 95%igen Alkohols

auswaschen. Das Filtrat bzw. Zentrifugat wird nun neuerdings im Vakuum unter Stickstoff, diesmal bis zur dicken Sirupkonsistenz eingeengt, der Rückstand mit der zwei- bis dreifachen Menge Alkohol aufgenommen und der Vorgang der Alkoholfällung so oft wiederholt, bis schließlich fast der gesamte Rückstand, der neben dem Melanogen vorwiegend Harnstoff und einen wesentlichen Teil der Harnfarbstoffe und Chromogene enthält, klar in Lösung geht. Man erhält so eine bei vorsichtigem Arbeiten orange gefärbte Lösung, in der das gesamte Melanogen fast unverändert enthalten ist. Bei Zutritt von Luft und längerem Stehen dunkelt diese Lösung beträchtlich nach. Die weitere Verarbeitung der alkoholischen Lösung richtet sich danach, ob es sich um das ätherlösliche Melanogen handelt bzw. ob das Stickstoff und Schwefel enthaltende Melanogen, dessen Vorkommen nach unseren Erfahrungen viel häufiger ist, vorliegt.

A. Isolierung und Eigenschaften eines stickstofffreien ätherlöslichen Melanogens.

(Experimentell mitbearbeitet von *Ludwig Popper.*)

Für die Isolierung des stickstofffreien, ätherlöslichen Melanogens ist die erstmals von *Thannhauser* (10) erhobene Feststellung, daß sich dieses Melanogen in Essigester leicht löst, von wesentlicher Bedeutung. Wir konnten uns in unserem Fall nicht dazu entschließen, so wie *Thannhauser* und *Weiß* das Melanogen zunächst als Bleisalz zu fällen, sind vielmehr so vorgegangen, daß wir den nach Entfernung der mit Alkohol fällbaren Salze erhaltenen alkoholischen Auszug im Vakuum unter Stickstoff bis nahezu zur Trockne eingeengt haben. Der bräunlich gefärbte Rückstand, aus dem reichlich Harnstoff auskristallisierte, wurde nun in möglichst wenig Wasser aufgenommen und zunächst mit reinem, peroxydfreiem Äther so lange geschüttelt, *bis in der wässerigen Phase die Eisenchloridreaktion negativ geworden war.* Die vereinigten ätherischen Auszüge wurden unter möglichster Vermeidung von Luftzutritt über geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Es ließ sich dabei nicht vermeiden, daß die anfangs leicht gelb gefärbten Auszüge beträchtlich nachdunkelten. Der Äther wurde nach dem Trocknen im Vakuum unter Stickstoff restlos abdestilliert und die braungefärbte Masse neuerlich mit wenig Wasser aufgenommen. Dabei blieb ein Teil in Form von braungefärbten Flocken ungelöst. Nach Filtration von diesen wurde nunmehr mit kleinen Portionen *Essigester* ausgeschüttelt, in welchen das Melanogen restlos hineinging. Eindunsten im Vakuum und Wiederaufnahme in jeweils frisch destillierten Essigester wurde so lange fortgesetzt, bis wir eine fast farblose Lösung erhielten. Diese wurde in einer Kristallisierschale in mit Stickstoff gefülltem Exsikkator im Vakuum eingedunstet. Es schieden sich einige Milligramm einer vollkommen farblosen, in prachtvollen prismatischen Nadeln kristallisierende Substanz ab.

Die Kristalle, die an der Luft sofort nachdunkelten, zeigten auf dem Platinblech einen scharfen Schmelzpunkt. In Wasser waren sie leicht löslich, die wässerige Lösung, welche rasches Nachdunkeln zeigte, reagierte stark sauer. *Die wiederholte Prüfung auf Stickstoff und Schwefel (Lassaigne) war vollkommen negativ.* Die Substanz reduzierte ammoniakalische Silberlösung bereits in der Kälte. Die Eisenchloridreaktion war im Gegensatz zu dem von *Thannhauser* und *Weiß* isolierten Melanogen nicht grün, sondern ging über ein dunkles Violett sofort in

braunschwarz über. Es kann sich also um *kein Brenzkatechinderivat* handeln. Da bei der enormen Empfindlichkeit der Substanz gegen den Luftsauerstoff ein Arbeiten mit der reinen Substanz nicht angezeigt war, versuchten wir durch Umsetzung mit Diazomethan die reaktionsfähigen Gruppen durch Methylierung festzulegen. Mit Diazomethan in ätherischer Lösung reagierte unsere Substanz unter starker Stickstoffentwicklung. Leider ging uns bei der Aufarbeitung unsere ganze Substanz verloren, so daß wir über die chemische Natur dieses ätherlöslichen stickstofffreien Melanogens nur Negatives aussagen können, nämlich, daß es mit dem von *Thannhauser* isolierten, als Homoprotokatechusäure angesprochenen Körper nicht identisch ist. Ob vielleicht unsere Substanz, höchstwahrscheinlich ein *Hydrochinonderivat*, mit dem von *Thannhauser* beschriebenen chloroformlöslichen Melanogen, das eine braune Eisenchloridreaktion gab, identisch ist, muß dahingestellt bleiben.

B. Darstellung des ätherunlöslichen stickstoffhaltigen Melanogens.

Bei der Isolierung dieses Melanogens ist es wesentlich, neben den Oxydations- und Reduktionsreaktionen ständig die *Thormählen*sche Reaktion sowie die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion zu verfolgen. Dies muß um so mehr betont werden, als sich nach unseren Erfahrungen in allen Melanogenharnen reichlich Fraktionen finden, welche die Eisenchloridreaktion sowie die Reduktionsproben (Silbernitrat, Ferrichlorid-Ferricyanid) geben und die, soweit wir heute beurteilen können, in die Fraktion der stickstofffreien Melanogene und der normalen Harnchromogene gehören.

Zur Isolierung des stickstoffhaltigen Melanogens haben wir eine Reihe von Verfahren geprüft, die neben dem eigentlichen Zweck auch der Absicht einer Fraktionierung der einzelnen reduzierenden Körper dienen sollten.

Zweifellos am günstigsten für die Isolierung des Melanogens ist die *Fällung aus alkoholischer Lösung mit Äther*, die allerdings den Nachteil hat, daß sie niemals quantitativ ist, vielmehr bleibt immer ein nicht unbeträchtlicher Anteil im Äther-Alkoholgemisch zurück. Zweckmäßig fällt man die alkoholische Lösung zunächst mit dem gleichen Volumen Äther aus. Die Ätherfällung ist in der Regel zunächst ölig (es hängt dies offenbar vom Wassergehalt ab). Das Öl wird nun mit absolutem Alkohol aufgenommen und unter Verwerfung eventuell unlöslicher Anteile die Fällung mit Äther wiederholt. Es gelingt so meist, schon bei der zweiten Umfällung das Melanogen in Form von rein weißen Flocken abzuscheiden. Freilich besteht bei dieser Art von Isolierung die Gefahr, daß der immer vorhandene Harnstoff bei einem allzu großen Überschuß von Äther mitgefällt wird. Je weniger Äther zur Fällung verwendet wird, um so geringer ist diese Gefahr, um so größer allerdings auch der Verlust an in Lösung bleibendem Melanogen. Bei vorsichtigem Arbeiten erhält man eine rein weiße Fällung,

die, nach dem Zentrifugieren und Waschen mit Äther, im Vakuum getrocknet ein nur leicht gelblich gefärbtes, ziemlich hygroskopisches Pulver darstellt. Die letzten Reste von Feuchtigkeit lassen sich bei 60° im Vakuum über Phosphorpentoxyd entfernen. Harnstoff konnten wir in diesen Präparaten mittels Xanthydrol nicht mehr nachweisen. Die Präparate enthalten jedoch immer noch wechselnde Mengen Asche, maximal bis zu rund 36%.

Statt des von uns verwendeten Äthylalkohols ist von *Fürth, Kaunitz* und *Friedrich* (12) sowie von *Linnell* und *Raper* (13) *Methylalkohol* verwendet worden. Zweifellos löst Methylalkohol das Melanogen wesentlich leichter als Äthylalkohol, bei dem oft erst Erwärmen bzw. Kochen zur Lösung führt. Diesem Vorteil steht als Nachteil gegenüber, daß zur Fällung wesentlich größere Mengen Äther nötig sind, wodurch die Gefahr der Mitfällung von Harnstoff, der sich auch in den durch Quecksilberacetatfällung erhaltenen Melanogenfraktionen findet, eine recht beträchtliche ist. Auf die durch die Ätherfällung bedingte Mitfällung gewisser Anteile der Harnchromogene soll später noch zurückgekommen werden.

Die Ätherfällung führt jedoch nicht immer zum Ziel. Namentlich bei Harnen, die längere Zeit gestanden sind, war es uns bei wiederholtem Umfällen nicht möglich, das Melanogen anders als in Form eines Öls abzuscheiden. In solchen Fällen sowie dort, wo es sich darum handelt, das die *Thormählen-* und *Ehrlich*sche Reaktion gebende Melanogen von den anderen reduzierenden Fraktionen abzutrennen, bleibt nichts anderes übrig, als die Fällung des Melanogens in Form *eines Salzes* zu versuchen. Unsere diesbezüglichen Erfahrungen lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Eine quantitative Fällung ist aus alkoholischer Lösung mittels gesättigter *alkoholischer Barytlösung*, die bis zur stark phenolphtaleinalkalischen Reaktion eingetragen wird, möglich. Man erhält so leicht gelblich gefärbte Bariumsalze, welche die gesamte, die *Thormählen-* und Aldehydreaktion gebende Melanogenfraktion enthalten. Allerdings hat die Fällung mittels Baryt einen Nachteil. Die Bariumsalze enthalten, auch wenn man sie auf der Zentrifuge mit Alkohol bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion wäscht, immer nicht unbeträchtliche Mengen von Bariumcarbonat, welche die Analyse fälschen. Eine Zerlegung des Bariumsalzes mit Schwefelsäure ist unbedingt zu vermeiden. Wir haben auf diese Weise wesentliche Anteile unserer Präparate verloren. Die Zerlegung der suspendierten Bariumsalze mit Kohlendioxyd ist ungemein verlustreich und nie quantitativ.

Die Fällung mit Quecksilbersalzen ist erstmals von *Eppinger* (8) ausgeführt worden, der das *Hopkins*sche Reagens (Quecksilbersulfat-Schwefelsäure) verwendet hat. In gleicher Weise wurde von *Feigl* und *Querner* (9) gearbeitet. Bei der enormen Säureempfindlichkeit des Melanogens möchten wir von der Anwendung des *Hopkins*schen Reagens unbedingt abraten. *Fürth* und *Friedrich* (14) fällten ebenso wie *Linnell* und *Raper* (13) ihr Melanogen aus essigsauren Lösungen mit Quecksilberacetat. Wir haben an unserer alkoholischen Lösung sowohl die Fällung mit *alkoholischem Quecksilberacetat* wie auch mit *alkoholischer Sublimatlösung* versucht. Quecksilberacetat hat den Nachteil, daß neben dem Melanogen auch Harnstoff mitgefällt wird, Sublimat vermeidet diesen Übelstand. Es besteht jeoch in beiden Fällen die Gefahr, daß sich der Niederschlag bei Luftzutritt rasch zersetzt. Um dies zu vermeiden, ist ein sofortiges gründliches Waschen der Quecksilberniederschläge mit Alkohol nötig, das bei Verwendung von Sublimat bis zur Chlorfreiheit des Waschalkohols durchgeführt werden muß. Aus den Quecksilberniederschlägen läßt sich durch

Zerlegen mit Schwefelwasserstoff das Melanogen in wässeriger Lösung gewinnen, allerdings nur dann brauchbar, wenn durch entsprechend langes Waschen die letzten Reste von Sublimat bzw. Acetat aus dem Niederschlag entfernt sind.

Ein scheinbar auch analytisch brauchbares Salz des Melanogens läßt sich erhalten, wenn man den gut gewaschenen *Quecksilberniederschlag in wässeriger Aufschwemmung in der Hitze mit Zinkstaub umsetzt.* Man erhält dann in der wässerigen Lösung das Zinksalz des Melanogens, das sich durch das gleiche Volumen Alkohol in vollkommen farblosen Flocken abscheiden läßt.

Aus der alkoholischen Lösung läßt sich auch eine *Kupferverbindung* des Melanogens durch Zusatz von alkoholischer Kupferacetatlösung gewinnen. Nach unseren Erfahrungen ist allerdings diese Art der Fällung am ungünstigsten.

Für Zwecke der Isolierung würden wir dort, wo die Fällung mit *Äther* nicht zum Ziele führt, am ehesten die *Barytfällung* bzw. die *Fällung mit alkoholischer Sublimatlösung* empfehlen, wobei bei der letzteren die *Umsetzung des Quecksilbersalzes in das Zinksalz* in Erwägung zu ziehen wäre.

C. Eigenschaften und Analysen des stickstoffhaltigen Melanogens.

Das durch Ätherfällung erhaltene Melanogen ist leicht gelblich gefärbt und nach dem Trocknen über Phosphorpentoxyd leicht pulverisierbar. Unter dem Mikroskop amorph, bei längerer Beobachtung zu kleinen Tröpfchen zerfließend. Das Melanogen löst sich spielend in Wasser, ebenso in absolutem *Methylalkohol*, weniger leicht in *absolutem Äthylalkohol* und ist aus alkoholischer Lösung durch *Äther* in Form weißer Flocken fällbar. Außer in Alkohol ist es in sämtlichen organischen Lösungsmitteln unlöslich.

Die Lösung des Melanogens gibt intensivste *Thormählen*sche und *Ehrlich*sche *Aldehydreaktion*, die Reduktion von *Ferrichlorid-Ferricyanid* ist stark positiv, ebenso wird *ammoniakalische Silberlösung* bereits in der Kälte, wesentlich rascher bei leichtem Erwärmen reduziert. Dadurch unterscheidet sich unser Präparat von dem von *Fürth* und *Friedrich* (14) dargestellten. Die *Ferrichlorid*-Reaktion führt direkt zu einer intensiven Braunschwarzfärbung. Die anfänglich farblose Lösung des Melanogens, die gegen Lackmus sauer reagiert, zeigt beim Stehen an der Luft bereits nach kurzer Zeit deutliche *Rotfärbung*, die dann über Braun in Schwarz übergeht. *Dabei verschwindet zuerst die Thormählen*sche *Reaktion*. Ist der Prozeß der Umwandlung nicht zuweit vorgeschritten, so läßt sich die *Thormählen*sche Reaktion durch Zusatz von Natriumcyanid wieder regenerieren. Sobald jedoch die Umwandlung weiter vorgeschritten ist, bleibt die *Thormählen*sche Reaktion dauernd negativ, welches Reduktionsmittel man auch immer verwendet. Man kann noch recht intensiv gefärbte Lösungen durch Zusatz von Bisulfit oder Hydrosulfit, ebenso wie durch naszierenden Wasserstoff (Zink und Salz-

säure) wesentlich aufhellen, ohne jedoch die *Thormählen*sche Reaktion regenerieren zu können.

Gegen Alkalien ist das Melanogen absolut resistent. Während schon Spuren von Säuren hinreichen, um eine rasche Verfärbung der Lösung in Rot zu erzielen, bleibt eine alkalische Lösung auch bei tagelangem Stehen an der Luft unverändert. Das Melanogen an sich ist *kein Chinonkörper.* Die für Chinone charakteristischen Reaktionen (Guajakprobe, Entbindung von Jod aus Kaliumjodid) sind sämtlich negativ. Im Gegenteil, das Melanogen hemmt die beim Stehen an Licht und Luft stets zu beobachtende Abspaltung von Jod aus einer Jodidlösung. Für die Umwandlungsfähigkeit in einen Chinonkörper spricht vielleicht die Tatsache, daß es gelingt, durch Zusatz von *2, 4-Dinitrophenylhydrazin* in 2 n Salzsäure ein Hydrazon zu erhalten. Da es uns trotz der verschiedensten Versuche nicht gelang, das Hydrazon, das mit alkoholischer Lauge eine intensive Rotfärbung zeigt, anders als in amorphen Flocken bzw. öligen Tropfen abzuscheiden, wurde auf seine weitere Untersuchung verzichtet. Eine *freie Aldehydgruppe* läßt sich nicht nachweisen (keine Reduktion *Fehling*scher Lösung, negative Reaktion mit Fuchsinschwefliger Säure). Die Proben auf Glucuronsäure sind sämtlich negativ. Sämtliche von uns dargestellten Melanogenfraktionen ergaben bei trockener Destillation positive Pyrrolreaktion (Fichtenspanreaktion). Die Gegenwart eines präformierten, instabilen *Pyrrolkernes* beweist der Ausfall der *Ehrlich*schen Aldehydreaktion.

In zwei von uns verarbeiteten Fällen konnten wir das durch Ätherfällung erhaltene Melanogen zur Analyse bringen. Melanogen I wurde aus eineinhalb Litern frischen Harns dargestellt, Melanogen II aus nicht ganz 100 ccm Leichenharn. Wir mußten uns in diesem Falle auf die Analyse von Stickstoff und Schwefel beschränken[1]. Die nachstehenden Analysenergebnisse sind sämtlich auf aschefreie Substanz berechnet.

Melanogen I.

Aschegehalt (Mittelwert) 35,5 %.

C, H-Bestimmung.	4,402 mg . . .	4,260 mg CO_2, 1,720 mg H_2O; C = 41,05 %, H = 6,79 %.
	4,371 mg . . .	4,240 mg CO_2, 1,675 mg H_2O; C = 40,85 %, H = 6,65 %.
N-Bestimmung.	3,218 mg	(Mikro-*Kjeldahl*), 1,60 ccm n/100 HCl, N = 11,16 %.
S-Bestimmung.	3,710 mg	(S-Bestimmung nach *Friedrich*), 0,1 ccm n/100 NaOH; S = 0,67 %.

[1] Für die Durchführung der Mikroanalysen sind wir dem Demonstrator des Instituts, Herrn Dr. *Otto Watzlaweck* zu Dank verpflichtet.

Melanogen II.

Aschegehalt (Mittelwert) 17,3 %.

N-Bestimmung: 3,618 mg (Mikro-*Kjeldahl*), 1,54 ccm n/100 HCl, N = 7,21 %.

S-Bestimmung: 2,668 mg (S-Bestimmung nach *Friedrich*), 0,15 ccm n/100 NaOH; S = 0,95 %.

Übersicht über die Analysenwerte.

	C in %	H in %	N in %	S in %	N : C	S : N
Melanogen I . .	40,95	6,75	11,16	0,67	1 : 4,28	1 : 36,9
„ II . .	—	—	7,21	0,97	—	1 : 17,35

Auf die Wiedergabe einer molaren Relation für sämtliche gefundene Elemente wollen wir mit Rücksicht darauf, daß unsere Melanogene zweifellos noch nicht rein sind, verzichten. Nur das Verhältnis N : C bzw. S : N soll uns hier etwas näher beschäftigen. Bei dem Melanogen I ist das Verhältnis N : C = 1 : 4,28, das ist annähernd dieselbe Relation, wie sie von *Fürth*, *Friedrich* und *Kaunitz* (11) und *Fürth* und *Friedrich* (14) bei ihrem auf einem anderen Wege dargestellten Melanogen gefunden wurde.

Wesentlich von den bisher vorliegenden Angaben weichen unsere Melanogene im Schwefelgehalt ab. In dem einen Fall beträgt der Schwefelgehalt 0,67 %, in den anderen 0,95 %. Die Relation S : N ergibt ein Verhältnis von 1 : 36,9 bzw. 1 : 17,35. Der Schwefelgehalt ist wesentlich niedriger als der, den *Linnell* und *Raper* (13) für ihre diversen Fraktionen finden und ebenso niedriger als der des Melanogens von *Fürth* und *Friedrich* (14), bei denen sich eine Relation von S : N wie 1 : 4,7 ergibt.

Da wir in einer Anzahl von Untersuchungen bei unseren noch wenig umgefällten Melanogenen eine deutlich positive *Jodazidreaktion* nach *Feigl* (15) nachweisen konnten, die allerdings bei fortschreitender Reinigung nur mehr spurenweise positiv blieb, legten wir uns die Frage vor, inwieweit der Schwefelgehalt unseres Melanogens durch *Sulfhydrylgruppen* bzw. durch einen Gehalt an *Ätherschwefelsäure* bedingt ist. Wir haben zu diesem Zweck bei dem ganz durchanalysierten Melanogen I die seinerzeit mit *Dell'Acqua* (16) ausgearbeitete Methodik zur Bestimmung des Sulfhydrylschwefels angewendet. Durch Formaldehyd wird das Reduktionsvermögen der Sulfhydrylgruppen gegenüber Ferrichlorid-Ferricyanid unterdrückt und wir hofften auf diese Weise, aus der Differenz der Berlinerblauwerte mit und ohne Formaldehydzusatz Anhaltspunkte für die Menge des Sulfhydrylschwefels in unserem Melanogen zu erhalten.

Von dem Melanogen wurden 27,3275 mg im Meßkolben auf 25 ccm Wasser gelöst und von dieser Lösung je 5 ccm mit und ohne Formalinzusatz mit Ferrichlorid-Ferricyanid nach der oben angegebenen Methodik umgesetzt. Nach Auffüllung auf 50 ccm wurde gegen einen Berlinerblau-Standard kolorimetriert. Die Gesamtreduktion der nicht behandelten Lösung entsprach 1,52 mg Berlinerblau, nach Formaldehydbehandlung 1,01 mg Berlinerblau. Durch Formaldehyd war also rund ein Drittel des Reduktionsvermögens (0,51 mg Berlinerblau entsprechend) unterdrückt worden. Rechnet man von dieser Menge auf Sulfhydrylschwefel um, so ergeben sich 0,0571 mg, die bei der verwendeten Menge von 5,4655 mg Melanogen einem Gehalt an Sulfhydrylschwefel von 1,045 % entsprechen würden, dem ein analytisch gefundener Schwefelgehalt von nur 0,67 % gegenübersteht. Wir haben nun weiter von der gleichen Lösung 11,55 ccm entsprechend 12,6253 mg Melanogen mit 3 ccm konzentrierter Salzsäure (*Merck*) und 2 ccm 5 %iger Bariumchloridlösung unter Rückfluß durch 45 Minuten zwecks Hydrolyse und Bestimmung der Ätherschwefelsäure gekocht. Der auf einem Mikrogoochtiegel abgesaugte und bis zur Gewichtskonstanz geglühte Rückstand von Bariumsulfat wog 0,600 mg, entsprechend 0,0824 mg Schwefel, d. s. auf Prozente umgerechnet 0,709 % Schwefel, der als Ätherschwefelsäure gebunden vorliegt.

Die Übereinstimmung zwischen dem analytisch festgestellten Schwefelgehalt von 0,67 % und dem durch Hydrolyse gefundenen von rund 0,71 % ist hinreichend, um daraus den Schluß zu ziehen, daß der gesamte Schwefel in unserem Melanogen als *Ätherschwefelsäure* gebunden vorliegt. Auch hier steht unser Befund in Widerspruch mit den Ergebnissen von *Linnell* und *Raper* (13), bei denen nur zwei Drittel bis drei Viertel des Gesamtschwefels als Ätherschwefelsäure vorliegen, ebenso zu dem Befund von *Fürth* und *Friedrich* (14), die nach der Methodik von *Friedrich* und *Mandl* (17) überhaupt nur 0,2 % des Schwefels als Ätherschwefelsäure nachgewiesen haben. Die Untersuchung zeigt weiter, daß die Unterdrückung des Reduktionsvermögens gegenüber Ferrichlorid-Ferricyanid durch Formaldehyd nicht unbedingt auf die Gegenwart von Sulfhydrylgruppen hinweisen muß, vielmehr dürften andere mit Formaldehyd reaktionsfähige Gruppen dafür verantwortlich sein. Von diesem Gesichtspunkte aus erklärt sich vielleicht auch die von *Fürth* und *Friedrich* (14) gefundene Tatsache, daß Formaldehyd die *Thormählen*sche Reaktion zum Verschwinden bringt[1]. Eines können wir auf Grund unserer Befunde mit Sicherheit aussagen, *daß Sulfhydrylgruppen für das Zustandekommen der Thormählen*schen *Reaktion bei diesem Melanogen nicht verantwortlich sind*. Einen weiteren Beweis dafür sehen wir in folgender Tatsache. Wir haben von unserem vierten Fall von Melanogenausscheidung ein Bariumsalz des Melanogens isoliert, dessen analytische Daten leider durch den beträchtlichen Gehalt des

[1] Die *Ehrlich*sche Aldehydreaktion des Melanogens wird allerdings, im Gegensatz zur Urobilinogenreaktion, durch Formaldehydzusatz *nicht* unterdrückt.

Salzes an Bariumcarbonat unbrauchbar sind. Dieses Bariumsalz, das intensivste *Thormählen*sche Reaktion ergab, war bei wiederholter Analyse beträchtlicher Mengen nach *Carius* vollkommen frei von Schwefel. Auch das scheint uns dafür zu sprechen, daß der Schwefelgehalt für das Zustandekommen der *Thormählen*schen Reaktion nicht in Frage kommt. Der Befund zeigt weiter, daß in dieser Gruppe auch mit *schwefelfreien Melanogenen* zu rechnen ist.

Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen einerseits und den Befunden von *Linnell* und *Raper* sowie *Fürth* und *Friedrich* scheint uns in Untersuchungen des einen von uns mit *Popper* (18), *Dell'Acqua* (16) und *Prinz* (19) und unveröffentlichten Arbeiten mit *Beneschovsky* über die Harnchromogene und die reduzierenden Körper des normalen menschlichen Harns, sowie in den Untersuchungen von *Linnell* und *Raper* gegeben zu sein. *Linnell* und *Raper* isolierten mittels ihrer Methode der Melanogendarstellung — Fällung des Melanogens mit ammoniakalischem Bleiacetat und, nach Zerlegung der Bleifällung mittels Kohlendioxyd, Fällung mit Quecksilberacetat — aus normalem Kaninchenharn Fraktionen, die stickstoff- und schwefelhaltig waren, jedoch keine Ätherschwefelsäure enthielten und Reduktion von Ferrichlorid-Ferricyanid zeigten. In unseren Untersuchungen konnten wir die reduzierenden Körper des normalen Harns aus alkoholischer Lösung durch Baryt aber auch durch Quecksilbersalze (Acetat und Chlorid) und Kupfersalze, sowie durch Äther fällen. Die Ätherfällung ergab jedoch stets nur ölige Produkte. All diesen Niederschlägen kommt ein sehr starkes Reduktionsvermögen gegen Ferrichlorid-Ferricyanid, ammoniakalische Silberlösung (bereits in der Kälte) und Jodsäure zu, alle zeigen größte Säureempfindlichkeit (Umwandlung in melaninähnliche Körper); mit Ferrichlorid geben sie, zum Unterschied von den von *Linnell* und *Raper* isolierten Produkten, eine intensive Braunfärbung. Der Schwefelgehalt ist vorwiegend auf Sulfhydrylschwefel zurückzuführen. Es scheint uns wahrscheinlich, daß bei den verschiedenen Darstellungen des Melanogens auch diese normalen Harnbestandteile — worauf auch *Linnell* und *Raper* hinweisen —, die gleiche Löslichkeit und gleiche Fällbarkeit wie das Melanogen zeigen, in wechselnder Menge mitgefällt werden. So würde die Abweichung in dem Gehalt an „neutralem" Schwefel in den verschiedenen Melanogenen ihre Erklärung finden, ebenso wie das von der *Raper*schen Theorie eines Dioxyindolkörpers abweichende Verhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff. Damit würde aber das Problem der Melanogendarstellung darauf hinausgehen, einen Weg zur Trennung dieser Körper zu finden.

Der in unseren unreinen Präparaten noch nachweisbare Gehalt an *Sulfhydrylschwefel* sowie der einer Sulfhydrylreaktion zum Verwechseln ähnliche Ausfall der Reaktion des Melanogens mit Nitroprussidnatrium-Kalilauge ließ uns zunächst die später als irrtümlich erkannte Vermutung aufstellen, daß die *Thormählen*-Reaktion durch die gleichzeitige Gegenwart von Sulfhydrylgruppen und eines zur Chinonbildung befähigten Körpers bedingt sei. Zur Stützung dieser Anschauung haben wir eine Reihe von Modellversuchen mit Brenzcatechin und Brenzkatechinderivaten (Adrenalin, Aminoacetobrenz-

catechin, Methyl- und Äthylaminoacetobrenzcatechin) sowie mit Hydrochinon angestellt.

Im einzelnen gestaltet sich die Versuchsanordnung wie folgt: zu je 2 ccm einer Cysteinlösung (entsprechend 4 mg Cystein) wurden ansteigende Mengen des Dioxybenzolkörpers (von 0,1 bis 2 ccm einer jeweils 0,1 %igen Lösung) zugesetzt, mit 0,5 ccm 2 n Natronlauge und 3 Tropfen Nitroprussidnatriumlösung versetzt und mit je 1 ccm Eisessig angesäuert.

Das Ergebnis war folgendes: Brenzcatechin und sämtliche Brenzcatechinderivate ergaben in höheren Konzentrationen von 1 bis 2 mg eine vorübergehende grünliche Färbung. *Hydrochinon dagegen ergab durchwegs eine der Thormählen-Reaktion entsprechende Blaufärbung*, am günstigsten bei einer Menge von 0,5 mg Hydrochinon auf den Ansatz. Die Blaufärbung verschwindet allerdings rasch und weicht einem mißfarbigen Braun. Zusatz von 1 ccm m/3 sekundärem Natriumphosphat auf den Ansatz stabilisiert sie für einige Zeit. Das der Chinonbildung unfähige Resorcin ergab der Voraussetzung entsprechend durchwegs negative Resultate (rotbraune Verfärbung), ebenso die Trioxybenzole Pyrogallol und Phloroglucin.

Wenn auch diese Modellversuche für den Mechanismus der eigentlichen *Thormählen*-Reaktion des Melanogens nichts aussagen, so könnten sie doch das vorübergehende Auftreten dieser Reaktion bei Gegenwart des ätherlöslichen Melanogens, das an sich keine *Thormählen*-Reaktion gibt, durch solches Zusammentreffen eines Dioxybenzolkörpers (Hydrochinonderivat ?) mit reichlicher ausgeschiedenen Sulfhydrylkörpern erklären. Nach noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen beruht die im Kaninchenharn nach Fütterung mit Kohl auftretende *Thormählen*-Reaktion zweifellos auf einem derartigen Synergismus von Dioxybenzolkörpern und Sulfhydrylverbindungen (Methylmerkaptan u. a.).

II. Über Zwischenstufen zwischen Melanogen und Melanin und über Melanin aus Melanogen und Tumormelanin.

Die Tatsache, daß unser durch Ätherfällung dargestelltes Melanogen zweifellos noch mit anderen, auch dem normalen Harn zugehörenden Stoffen verunreinigt ist, ließ die Erwartung aufkommen, vielleicht auf dem Wege der Umwandlung von Melanogen in Melanin diese Ballaststoffe zu verlieren und so zu Produkten zu gelangen, deren analytisches Verhalten eher Anhaltspunkte für die ursprüngliche Konstitution des Melanogens geben könnte.

Wir haben zu diesem Zweck ein Bariumsalz des Melanogens, das aus dem gleichen Harn wie unser Melanogen I erhalten worden war, in absolutem Methylalkohol aufgenommen und tropfenweise mit 10 n Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt. Vom ausfallenden Bariumsulfat wurde zentrifugiert und der rotgefärbte Methylalkohol mit absolutem Äther bis zur Fällung eines dunkelroten Körpers versetzt. Dieser wurde

zentrifugiert und die Umfällung aus absolutem Methylalkohol, in dem der Körper spielend löslich ist, mit Äther im ganzen dreimal wiederholt. Schließlich wurde der Körper auf der Zentrifuge wiederholt mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen ließ sich der dunkelrot gefärbte Körper leicht pulverisieren. In Wasser, Methyl- und Äthylalkohol ist er leicht mit roter Farbe löslich. Die *Thormählen*-Reaktion ist vollkommen negativ. Eventuelle Sulfhydrylgruppen bzw. Disulfidverbindungen lassen sich auch nach Zusatz von Natriumcyanid nicht nachweisen. Schweflige Säure hellt, im Gegensatz zum Verhalten des *Raper*schen „roten Körpers", nicht nennenswert auf. In analoger Weise wurde durch etwas längeres Einwirken der Säure aus dem gleichen Bariumsalz ein braungefärbtes Umwandlungsprodukt dargestellt, das sich in seiner Löslichkeit und seinem sonstigen Verhalten ganz analog dem roten Körper verhielt. Die Ergebnisse der Analysen beider Körper zeigt nachstehende Zusammenstellung:

„*Roter Körper.*"

Aschegehalt (Mittelwert) 1,25 %.

C, H-Bestimmung. 3,594 mg . . . 6,050 mg CO_2, 1,870 mg H_2O; C = 46,56 %, H = 5,90 %.
5,880 mg . . . 9,850 mg CO_2, 2,870 mg H_2O; C = 46,23 %, H = 5,52 %.

N-Bestimmung. 7,109 mg (Mikro-*Kjeldahl*) 1,03 ccm n/50 HCl; N = 4,10 %.
4,890 mg (Mikro-*Kjeldahl*) 0,73 ccm n/50 HCl; N = 4,22 %.

S-Bestimmung. 8,254 mg (S-Bestimmung nach *Friedrich*) 1,20 ccm n/50 NaOH; S = 4,72 %.
7,825 mg (S-Bestimmung nach *Friedrich*), 1,11 ccm n/50 NaOH; S = 4,60 %.

„*Brauner Körper.*"

Aschegehalt (Mittelwert) 1,60 %.

C, H-Bestimmung. 5,926 mg . . . 10,200 mg CO_2, 3,000 mg H_2O; C = 47,70 %, H = 5,75 %.
3,442 mg . . . 5,910 mg CO_2, 1,700 mg H_2O; C = 47,59 %, H = 5,61 %.

N-Bestimmung. 8,384 mg (Mikro-*Kjeldahl*) 1,48 ccm n/50 HCl; N = 5,02 %.
8,280 mg (Mikro-*Kjeldahl*) 1,45 ccm n/50 HCl; N = 5,00 %.

S-Bestimmung. 6,509 mg (S-Bestimmung nach *Friedrich*) 0,70 ccm n/50 NaOH; S = 3,50 %.
6,566 mg (S-Bestimmung nach *Friedrich*) 0,75 ccm n/50 NaOH; S = 3,71 %.

Übersicht der Analysenwerte.

	C in %	H in %	N in %	S in %	N : C	S : N
Roter Körper .	46,38	5,71	4,16	4,66	1 : 13	1 : 2,01
Brauner Körper	47,65	5,68	5,01	3,60	1 : 11,1	1 : 3,18

Im Vergleich zu dem Melanogen I fällt zunächst einmal der wesentlich niedrigere Stickstoffgehalt und der wesentlich höhere Gehalt an Schwefel auf. Die Relation N : C ist für den roten Körper 1 : 13, für den braunen Körper 1 : 11,1 gegenüber einer N : C-Relation des Melanogens von 1 : 4,28. Dagegen hat sich die Relation Schwefel zu Stickstoff wesentlich verschoben. Sie beträgt bei dem roten Körper rund 1 : 2, bei dem braunen Körper 1 : 3,18. Es müssen hier also zweifellos stickstoffhaltige Körper, die dem Melanogen I anhafteten, bei der Umwandlung beseitigt worden sein. Auffallend bei diesen Körpern ist die Übereinstimmung, welche ihr Stickstoffgehalt mit einigen von *Bloch* und *Schaaf* (1) dargestellten Dopamelaninen zeigt. Nach den Untersuchungen von *Bloch* und *Schaaf* geht nun die Melaninbildung aus Dioxyphenylalanin unter teilweiser Abspaltung von Stickstoff und CO_2 vor sich, während der überwiegende Teil des Aminostickstoffs in ringförmige Bindung übergeht. Ob für die Umwandlung unseres Melanogens in die Stufe der Melanine ähnliche Verhältnisse anzunehmen sind, muß dahingestellt sein. Untersuchungen, die wir an einem aus Melanogen dargestellten Melanin vergleichend mit Tumormelanin anstellen konnten, sprechen eher gegen diese Annahme.

Zur Darstellung des *Harnmelanins* gingen wir von einem mittels Sublimatfällung erhaltenen, jedoch nicht vollkommenen Cl-frei gewaschenen Quecksilbersalz aus. Dieses wurde, nachdem es sich trotz Stehens unter Alkohol vollkommen schwarz gefärbt hatte, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die schwarzbraune, schwach salzsaure Lösung vom Quecksilbersulfid filtriert, Schwefelwasserstoff im Vakuum entfernt und zur Trockne gebracht. Der dunkelbraunschwarze Rückstand wurde in absolutem Alkohol aufgenommen. Da sich auf Ätherzusatz nur eine ölige Fällung erhalten ließ, wurde die alkoholische Lösung mit reichlich Aceton versetzt, durch das eine Fällung in feinen schwarzen Flocken erfolgte. Nach Zentrifugieren wurde nochmals mit Alkohol aufgenommen, die Acetonfällung wiederholt, das Präparat auf der Zentrifuge wiederholt mit Aceton gewaschen und schließlich im Vakuum bei 100° getrocknet.

Zur vergleichenden Darstellung des Tumormelanins verarbeiteten wir Metastasen aus der Leber und eine ungefähr 300 g schwere Metastase aus dem Netz. Das Material stammt von dem gleichen Fall wie unser Melanogen II.

Um einer Zerstörung oder Veränderung des Melanins bei der Aufarbeitung möglichst vorzubeugen, haben wir einen von der sonst üblichen Methode der Hydrolyse der Organe abweichenden Weg eingeschlagen. Die durch die Fleischmaschine getriebenen Tumormassen wurden zur Entfernung gröberer Bindegewebspartikelchen durch ein feines Haarsieb getrieben und der so erhaltene braunschwarze Brei im Gewicht von 300 g mit 3 Liter 2%iger Natriumbicarbonatlösung angerührt und 10 g Pankreatin absolut. (Rhenania), in 100 ccm 2%iger Natriumbicarbonatlösung aufgeschwemmt, zugesetzt. Der Ansatz wurde unter Toluol in den Brutschrank gestellt und nach einigen Tagen neuerlich die gleiche Menge Pankreatin zugefügt. Nach 14tägiger Inkubation ließ sich in dem Ansatz, der

keinerlei Zeichen von Fäulnis zeigte, koagulables Eiweiß nicht mehr nachweisen. Nunmehr wurde im Scheidetrichter vom Toluol und einer aus feinsten Bindegewebsfasern bestehenden Zwischenschicht abgetrennt und die braunschwarze kolloidale Lösung des Melanins mit Essigsäure eben angesäuert. Da eine Trennung des in feinster Verteilung ausfallenden Melanins durch Absaugen bzw. Filtration unmöglich war, wurde der Ansatz in Portionen jeweils mit dem halben Volumen Chloroform versetzt und gründlich geschüttelt. Beim Zentrifugieren der so entstandenen Emulsion schied sich das Melanin an der Grenzschicht in Form einer kompakten Scheibe ab, die sich nach Abhebern der überstehenden Flüssigkeit mit Leichtigkeit vom Chloroform abtrennen ließ. Das derartig gewonnene Melanin wurde nun neuerlich mit verdünnter Essigsäure (ungefähr n/10) angerührt, neuerlich mit Chloroform geschüttelt und das Waschen und die Adsorption an die Grenzschicht Wasser—Chloroform so oft wiederholt, bis die überstehende wässerige Lösung vollkommen biuretfrei war und auch kein Farbstoff (hauptsächlich Hämatin) in das Chloroform mehr überging. Bei den letzten Waschungen mußten wir, da sich die Essigsäure als zu schwach erwies, normale Salzsäure zum Aufschwemmen des Melanins verwenden. Das derartig erhaltene Melanin wurde nun auf der Zentrifuge zunächst mit Salzsäure—Alkohol solange gewaschen, bis der Alkohol keine Braunfärbung mehr zeigte, dann mit 80%igem und später mit 96%igem Alkohol chlorfrei gewaschen. Nach Aufschwemmung mit Äther ließ sich die Substanz einwandfrei im Goochtiegel absaugen und wurde schließlich im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Das derartig dargestellte Melanin ist ein lockeres braunschwarzes Pulver, das in Wasser unlöslich ist, sich dagegen leicht in Lauge, schwerer schon in konzentriertem Ammoniak mit braunschwarzer Farbe löst. In Soda und sekundärem Natriumphosphat ist das Melanin praktisch unlöslich, in konzentrierter Salzsäure löst es sich langsam auf und fällt beim Verdünnen wieder aus. Zum Unterschied von dem aus dem Harnmelanogen erhaltenen Melanin ist es in Alkohol vollkommen unlöslich. Das Melanin enthält immer noch Asche (rund 5%). In dem zur Analyse gebrachten Präparat war im Gegensatz zu den wenig gereinigten Präparaten kein Eisen mehr nachweisbar. Die analytischen Daten beider Melanine zeigt nachfolgende Übersicht.

Melanin aus Harnmelanogen, „Säure-Melanin".

Aschegehalt (Mittelwert) 8%.

C, H-Bestimmung.	4,024 mg . . .	6,500 mg CO_2, 1,900 mg H_2O; C = 48,0%, H = 5,73%.
	4,298 mg . . .	6,925 mg CO_2, 2,060 mg H_2O; C = 47,8%, H = 5,81%.
N-Bestimmung.	4,170 mg	(Mikro-*Kjeldahl*) 1,56 ccm n/50 HCl; N = 11,69%.
	3,419 mg	(Mikro-*Kjeldahl*) 1,30 ccm n/50 HCl; N = 11,60%.
S-Bestimmung.	6,490 mg	(Bestimmung nach *Friedrich*) 0,55 ccm n/50 NaOH; S = 2,72%.
	7,000 mg	(Bestimmung nach *Friedrich*) 0,65 ccm n/50 NaOH; S = 2,97%.

Tumor-Melanin.

Aschegehalt (Mittelwert) 5 %.

C, H-Bestimmung. 3,877 mg . . . 7,140 mg CO_2, 1,890 mg H_2O; C = 52,87 %, H = 5,74 %.
3,577 mg . . . 6,600 mg CO_2, 1,760 mg H_2O; C = 52,97 %, H = 5,79 %.

N-Bestimmung. 8,966 mg (Mikro-*Kjeldahl*) 7,34 ccm n/100 HCl; N = 12,06 %.
6,876 mg (Mikro-*Kjeldahl*) 5,67 ccm n/100 HCl; N = 12,25 %.

S-Bestimmung. 9,745 mg (Bestimmung nach *Friedrich*), 1,75 ccm n/100 NaOH, S = 3,03 %.
6,915 mg (Bestimmung nach *Friedrich*), 1,32 ccm n/100 NaOH; S = 3,22 %.

Übersicht der Analysenwerte.

	C in %	H in %	N in %	S in %	N : C	S : N
Melanin aus Harnmelanogen (Säuremelanin)	47,9	5,77	11,64	3,09	1 : 4,8	1 : 8,61
Tumor-Melanin	52,92	5,76	12,10	3,12	1 : 4,98	1 : 9,07

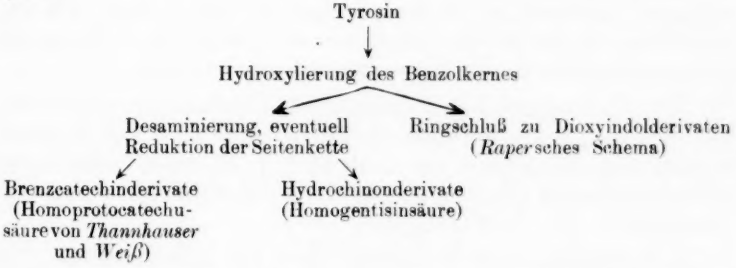
Überblickt man die analytischen Ergebnisse, so zeigen beide Melanine eine immerhin auffallende Übereinstimmung. Wohl ist der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt bei dem aus Tumormaterial erhaltenen Melanin etwas höher als bei dem aus Harnmelanogen erhaltenen Produkt. Die molare Relation Stickstoff zu Kohlenstoff ist aber bei beiden Präparaten fast gleich. Beim Tumormelanin 1 : 4,986, beim Melanin aus Harnmelanogen 1 : 4,8. Ähnlich nahe liegen die Relationen von Schwefel zu Stickstoff, die beim Tumormelanin 1 : 9,07, beim Harnmelanin 1 : 8,61 betragen. Auffallend ist jedenfalls, daß die bei beiden Melaninkörpern gefundene Relation N : C (= 1 : 5) auch für das Harnmelanogen von *Fürth*, *Friedrich* und *Kaunitz* (12) sowie von *Fürth* und *Friedrich* (14) und annähernd auch für unser Melanogen I festgestellt wurde. Das steht bis zu einem gewissen Grad in Widerspruch zu der sonst für Melanine gefundenen Relation, die durchgehend höher, zwischen 1 : 6 bis rund 1 : 8, gefunden wurde (20). Ob diese Abweichung durch die verschiedene Art der Darstellung bedingt ist, müßten vergleichende Untersuchungen an dem gleichen Material ergeben. Dieselben Differenzen ergeben sich auch zwischen unseren Produkten und den künstlich aus Tyrosin bzw. Dioxyphenylalanin erhaltenen Melaninen. Könnte man für unser durch tryptische Verdauung erhaltenes Tumormelanin den Einwand erheben, daß hier der höhere Stickstoffgehalt durch noch anhaftende Eiweißreste bedingt ist, ein Einwand, den wir allerdings auf Grund unserer sorgfältigen Kontrollen bei der Darstellung nicht gelten lassen können, so trifft dies

für das durch Säureeinwirkung auf Harnmelanogen erhaltene Melanin nicht zu. Hier wäre freilich daran zu denken, daß wir auch die dem Melanogen anhaftenden normalen Harnbestandteile mit in den Farbstoff hineinbekommen haben. Läßt man beide Einwände gelten, so bleibt immerhin die auffallende Übereinstimmung zwischen beiden Melaninen zu erklären, eine Übereinstimmung, die uns doch nicht ganz zufällig erscheint. Viel gewichtiger ist allerdings die Tatsache, daß unsere gefärbten Zwischenprodukte in ihrer elementaren Zusammensetzung wesentlich von dem erhaltenen Melanin abweichen. Die Annahme einer Abspaltung von Kohlendioxyd beim Übergang der Zwischenstufen in das eigentliche Melanin, wie sie von *Bloch* und *Schaaf* (1) bei der Bildung des Dopamelanins gefunden wurde, könnte eventuell die Differenzen erklären, ist aber vorläufig gänzlich unbewiesen.

III. Zur Theorie der Melanogen- und Melaninentstehung.

Versuchen wir die Ergebnisse unserer Untersuchung für die Theorie der Melanogen- bzw. Melaninbildung nutzbar zu machen, so ist zunächst einmal die Feststellung wesentlich, auf die bereits von *Fürth* und *Kaunitz* (11) hingewiesen wurde, daß wir unter dem Begriff Melanogen zumindest zwei Körperklassen zusammenfassen müssen, von denen die eine durch ihre Löslichkeit in Äther sowie durch das Fehlen von Stickstoff und Schwefel von der offenbar weit häufigeren Form der Stickstoff und meistens auch Schwefel enthaltenden Gruppe von Melanogenen zu trennen ist. Dabei möchten wir auf Grund unserer Erfahrungen darauf hinweisen, daß in den Fällen, in denen das stickstoffhaltige Melanogen vorliegt, neben diesem auch reichlich Körper von Melanogencharakter nachweisbar sind, die offenbar der ersten Gruppe der ätherlöslichen Melanogene angehören. Wir haben in allen unseren Fällen neben dem Stickstoff enthaltenden, die *Thormählen*-Reaktion gebenden Melanogen reichlich ätherlösliche Fraktionen erhalten, die zum Teil in kristalliner Form abgeschieden werden konnten und die sämtlich starkes Reduktionsvermögen gegenüber ammoniakalischer Silberlösung und Ferrichlorid-Ferricyanid zeigten und bei denen durchweg die Reaktion mit Ferrichlorid positiv war (ohne deutlichen Farbübergang braunschwarze bzw. dunkelviolette Färbungen). Eine Trennung und Aufarbeitung dieser quantitativ nicht unerheblichen Fraktionen, die zum Teil auch positive *Millon*-Reaktion zeigten, haben wir nicht durchgeführt, wir erwähnen sie jedoch, weil sie uns, wie wir glauben, einen Anhaltspunkt für eine gemeinsame Auffassung der der Melanogenausscheidung bzw. der Melaninbildung zugrundeliegenden Stoffwechselstörung geben können. Stellt man in den Mittelpunkt der Betrachtung den Stoffwechsel des *Tyrosins*, so lassen sich zwanglos das stickstoffenthaltende und das stickstofffreie Melanogen durch die bisher bekannten Abbauwege des

Tyrosins erklären. Der *primäre Vorgang* scheint in allen Fällen eine *weitere Hydroxylierung des aromatischen Kernes* zu sein. Die Regel dürfte die durch die Untersuchungen *Rapers* als erster Schritt der Tyrosinasewirkung sichergestellte *Einführung des Hydroxyls* in *Orthostellung* sein, die zum *Dioxyphenylalanin* führt. Von diesem aus wäre sowohl der Weg zu der von *Thannhauser* wahrscheinlich gemachten *Brenzcatechinessigsäure*, als auch zu den von *Raper* sichergestellten *Dioxyindolderivaten* möglich. Neben diesem Eintritt der Hydroxylgruppe in Orthostellung ist jedoch dem Organismus auch die Umwandlung des Tyrosins in ein *Hydrochinonderivat* gangbar, wie wir aus dem Beispiel der Homogentisinsäureausscheidung bei Alkaptonurie wissen. Es scheint uns nach unseren Ergebnissen, sowohl was unseren ersten Fall des stickstofffreien Melanogens anlangt, als auch mit Rücksicht auf die bei unseren anderen Melanogenen gemachten Erfahrungen über ätherlösliche Fraktionen von Melanogencharakter sicher, daß auch dieser zweite Weg bei der Stoffwechselstörung, wie sie beim Melanosarkom vorliegt, vom Organismus eingeschlagen wird. Wie wir in unseren Untersuchungen über die reduzierenden Harnfarbstoffe nachweisen konnten (18), findet sich in der Fraktion der Polyphenole ein Körper, dessen eminente Reduktionsfähigkeit gegenüber ammoniakalischer Silberlösung und Silbernitrat auf ein derartiges Hydrochinonderivat hindeutet. Es scheint uns in hohem Grade wahrscheinlich, daß unsere ätherlöslichen Fraktionen in diese Gruppe von Körpern gehören. Das nachstehende Schema mag diese unsere Anschauung kurz wiedergeben.



Eine restlose Klärung des ganzen Komplexes ist jedoch erst dann zu erwarten, wenn es gelungen ist, das Melanogen bzw. die Melanogene einwandfrei zu isolieren und chemisch zu identifizieren.

Zusammenfassung.

1. Auf Grund der bei Aufarbeitung von vier Fällen von Melanogenausscheidung gewonnenen Erfahrungen wird eine Methodik angegeben, die es ermöglicht, sowohl *ätherlösliche* als auch *ätherunlösliche Melanogene*

ohne Anwendung von Schwermetallsalzen zu isolieren. Sie besteht im wesentlichen in der wiederholten Fällung des unter Stickstoffatmosphäre im Vakuum eingeengten Harns mit 95%igem Alkohol und *Überführung* der Melanogene *in alkoholische Lösung*.

2. Ein *ätherlösliches Melanogen* wurde, entsprechend den Angaben von *Thannhauser* und *Weiß*, aus wässeriger Lösung durch Ausschütteln mit Essigester *kristallisiert* erhalten. Es war stickstoff- und schwefelfrei, zeigte deutlich saure Eigenschaften und ließ sich mit Diazomethan in ätherischer Lösung methylieren. Die Reaktion mit Eisenchlorid ergab, daß *kein Brenzcatechinderivat* vorlag.

3. Die neben den Oxydationsreaktionen auch die *Thormählen*sche und *Ehrlich*sche Aldehydreaktion gebenden *ätherunlöslichen Melanogene* lassen sich *aus alkoholischer Lösung mittels Äther* in Form rein weißer Flocken fällen. Nach der Ätherfällung ergaben die günstigsten Verhältnisse die *Fällung mit alkoholischer Barytlösung* bzw. *alkoholischer Sublimatlösung*. Die durch Ätherfällung erhaltenen Präparate, die sämtliche Melanogenreaktionen geben, sind zweifellos *keine Chinonkörper* und erhalten auch *keine freien Aldehydgruppen*. Die Analysenwerte ergaben an einem Präparat ein Verhältnis von N : C wie 1 : 4,28. Der Schwefelgehalt war auffallend niedrig, der *gesamte Schwefel liegt in Form von Ätherschwefelsäure vor*. *Sulfhydrylschwefel* ist an dem Zustandekommen der *Thormählen*schen Reaktion *nicht* beteiligt. Ein Melanogenpräparat wurde schwefelfrei gefunden.

Die dargestellten Melanogene sind zweifellos noch nicht als reine Präparate anzusprechen, sondern dürften wechselnde, ihnen von der Darstellung her anhaftende Mengen aus der Fraktion der Chromogene und reduzierenden Körper des normalen Harns enthalten.

4. Durch kurzdauernde Säureeinwirkung auf Melanogene wurden rot- bzw. braungefärbte *Zwischenkörper* erhalten, bei denen sich die Relation Stickstoff zu Kohlenstoff wie 1 : 13 bzw. 1 : 11 ergab. Gleichzeitig wurden wesentlich *höhere Schwefelwerte* wie bei Melanogen festgestellt (Verhältnis S : N = 1 : 2 bzw. 1 : 3).

5. Vergleichende Untersuchung eines aus Tumormaterial in schonendster Weise (Verdauung mit Trypsin) dargestellten *Tumormelanins* und eines durch Säureeinwirkung aus *Harnmelanogen* enthaltenen „Säuremelanins" ergaben Unterschiede in der Löslichkeit beider Produkte. Analytisch ergeben beide Präparate eine auffallende Übereinstimmung des Verhältnisses N : C, das rund 1 : 5 gefunden wurde und des Verhältnisses S : N, das bei rund 1 : 9 liegt.

6. Auf Grund der bisher vorliegenden Tatsachen und der eigenen Ergebnisse wird versucht, eine Theorie der Melanogenbildung zu ent-

wickeln, in deren Mittelpunkt der Stoffwechsel des Tyrosins steht und die sowohl die Entstehung der ätherlöslichen, stickstofffreien Melanine, als auch die Bildung der stickstoffhaltigen, ätherunlöslichen Melanine von einem einheitlichen Gesichtspunkt aus zu erklären versucht.

Literatur.

1) *Bloch* u. *Schaaf*, diese Zeitschr. **162**, 181, 1925. — 2) *Schmalfuß* u. *Müller*, ebenda **163**, 362, 1927 ff. — 3) *Raper* u. *Wormall*, Biochem. J. **17**, 454, 1923. — 3a) *Dieselben*, ebenda **19**, 84, 1925. — 4) *Happold* u. *Raper*, ebenda **19**, 92, 1925. — 5) *Raper* u. *Speakman*, ebenda **20**, 69, 1926. — 6) *Raper*, ebenda **20**, 735, 1926. — 7) *Derselbe*, ebenda **21**, 89, 1927. — 8) *Eppinger*, diese Zeitschr. **28**, 181, 1910. — 9) *Feigl* u. *Querner*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **123**, 107, 1917. — 10) *Thannhauser* u. *Weiß*, Verh. d. Deutsch. Ges. f. inn Med., 34. Kongr. 1922, S. 156. — 11) *Fürth* u. *Kaunitz*, diese Zeitschr. **253**, 231, 1932. — 12) *Fürth, Friedrich* u. *Kaunitz*, Wien. klin. Wochenschr. **1935**, Nr. 20. — 13) *Linnell* u. *Raper*, Biochem. J. **29**, 76, 1935. — 14) *Fürth* u. *Friedrich*, Wien. klin. Wochenschr. **1935**, Nr. 35. — 15) *Feigl*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **74**, 369, 1929. — 16) *Barrenscheen* u. *Dell'Acqua*, diese Zeitschr. **219**, 297, 1930. — 17) *Friedrich* u. *Mandl*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **216**, 68, 1933. — 18) *Barrenscheen* u. *Popper*, diese Zeitschr. **161**, 210, 1925. — 19) *Barrenscheen* u. *Prinz*, ebenda **284**, 99, 1936. — 20) *Heinlein*, ebenda **154**, 24, 1924.

Bemerkungen zu einer Arbeit von G. Groscurth und R. Havemann über Carb-Hämoglobin.

Von

F. J. W. Roughton.

(Aus dem Physiological Laboratory, Cambridge, England.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1935.)

Margaria und *Green* (1) veröffentlichten im Jahre 1933 Messungen des Gesamtkohlensäuregehalts, ΣCO_2, des CO_2-Druckes, $p\,CO_2$, und des p_H von Hämoglobinlösungen, die mit verschiedenen CO_2-Spannungen gesättigt waren. Die Ergebnisse ließen sich mit der *Debye-Hückel*schen Form der *Hasselbalch*schen Gleichung nicht in Übereinstimmung bringen

$$p_H = p\,k_1' + \log \frac{[HCO_3']}{\alpha\, p\,CO_2} \tag{1}$$

wo

$$p\,k_1' = 6{,}33 - 0{,}5\sqrt{\mu}\ (37^0\ C) \tag{2}$$

μ = die Ionenstärke

α = der Löslichkeitskoeffizient der CO_2 ist,

wenn die Berechnung unter der Annahme erfolgte, daß die gesamte chemisch gebundene Kohlensäure als Bicarbonat vorliegt. Die Autoren nahmen daher an, daß ein Teil der chemisch gebundenen Kohlensäure direkt an Hämoglobin als $HbCO_2$ gebunden ist; sie berechneten die Mengen von $HbCO_2$ unter verschiedenen Bedingungen aus der Größe der Abweichungen von Gl. (1).

Groscurth und *Havemann* (2) haben kürzlich diese Untersuchungen an reduzierten Hämoglobinlösungen fortgesetzt (p_H 6,4 bis 7,6; $p\,CO_2$ 80 bis 120 mm Hg; 37° C). Unter der Annahme, daß das gesamte $HbCO_2$, das man nach der Berechnung nach *Margaria* und *Green* erhält, die Carbaminoverbindung des Hb ist, berechnen die Autoren Werte für das pK der NH_2-Gruppe des reduzierten Hämoglobins, die mit Kohlensäure reagieren soll, und ferner für das pK der gebildeten Carbaminosäure.

Der Verfasser hat bereits früher Einwände gegen diese Methode erhoben (3), die jedoch von *Groscurth* und *Havemann* nicht berücksichtigt sind. Es ist daher angebracht, diese Einwände hier zu erläutern.

1. Wenn man Gl. (2) für Hb-Lösungen anwenden will, muß man eine Annahme über den Einfluß von Hb auf die Ionenstärke machen. *Margaria* und *Green* nahmen an, daß Hb hier als einwertiger Elektrolyt wirkt. Würde jedoch Hb als zwei- oder mehrwertiger Elektrolyt wirken, wie es in den Löslichkeitsversuchen von *Cohn* und *Prentiss* (4) der Fall ist, so wären die für $HbCO_2$ berechneten Werte viel zu hoch. Würde andererseits Hb, wie in gewissen Versuchen über den osmotischen Druck, eine geringere Wirkung haben als *Margaria* und *Green* annahmen, so wären die für $HbCO_2$ berechneten Werte zu klein. Das Fehlen unabhängiger und zuverlässiger Daten über den Einfluß von Hb auf die Aktivitätskoeffizienten macht exakte Berechnungen von $HbCO_2$ aus elektrometrischen Messungen unmöglich.

2. Selbst wenn diese Schwierigkeiten überwunden werden könnten, würden die Gl. (1) und (2) nicht nur die Carbaminoverbindung des Hb ergeben, sondern die Summe der Konzentrationen aller Verbindungen, die CO_2, H_2CO_3, HCO_3' und CO_3'' mit Hb eingehen könnten. In den erwähnten früheren Arbeiten habe ich schwerwiegendes Beweismaterial dafür beigebracht, daß CO_2 mit Hb neben der Carbaminoverbindung mindestens noch ein anderes Derivat liefert. Unter den Verbindungen, die möglich sind, erscheint als die wahrscheinlichste eine Bindung von HCO_3-Ionen durch Hb, analog der Bindung von Cl- und Phosphationen, die durch die Arbeiten von *Adair* (5) wahrscheinlich gemacht worden ist.

Die Zahlen von *Groscurth* und *Havemann* für Carbamino-CO_2 würden demnach um einen unbestimmten Betrag zu hoch sein, und zwar auch dann, wenn Gl. (1) und (2) brauchbar wären. Tatsächlich sind ihre Zahlen viel höher als die Zahlen von *Meldrum* und *Roughton* (6) und von *Ferguson* und *Roughton* (7). Es dürfte daher nicht erlaubt sein, ihre Zahlen für die Ableitung der pK-Werte der Aminogruppe des Hb, mit der CO_2 reagiert, und der dadurch gebildeten Carbaminosäure zu benutzen.

Unserer Meinung nach ist *Faurholts* Methode in der Modifikation von *Ferguson* und *Roughton* (7) das einzige bisher beschriebene Verfahren, mit dem die Carbaminoverbindung des Hb in befriedigender Weise bestimmt werden kann. Die Methode besteht in rascher Alkalisierung der Lösung mit NaOH und Mischung mit $BaCl_2$. Hierdurch wird HCO_3' vollständig als $BaCO_3$ niedergeschlagen. Die nach Zentrifugieren in der überstehenden Flüssigkeit verbleibende Kohlensäure stellt die ursprünglich als Carbaminoverbindung des Hb gebundene Kohlensäure dar (nachdem einige kleine Leerwerte abgezogen sind). *Groscurth* und *Havemann* machen hierzu folgenden, vielleicht einleuchtenden Einwand: „Bedenkt man die außerordentliche Empfindlichkeit besonders des Hämoglobins gegenüber solchen Alkalimengen, so ergibt sich, daß diesen Messungen kaum mehr als eine qualitative Bedeutung zukommt."

Fergusons und *Roughtons* Arbeit enthält indessen folgende Vorsichtsmaßnahmen und Kontrollen, die sich speziell gerade gegen diesen Einwand richten.

1. Als Versuchsmaterial diente Rinder-Hb, weil diese Hb-Art bekanntlich besonders widerstandsfähig gegen Denaturierung in alkalischer Lösung ist.

2. Die Ausbeute an Carbamino-CO_2 zeigte sich innerhalb weiter Grenzen unabhängig von der angewandten NaOH-Konzentration, während Geschwindigkeit und Grad der Denaturierung bekanntlich schnell mit der Alkalikonzentration ansteigen.

3. Die Abnahme der O_2-Kapazität während der Reaktion überschritt 3% nicht. Die Abnahme der O_2-Kapazität wird allgemein als sehr empfindlicher Indikator für Veränderungen im Hb-Molekül angesehen.

4. Nach spektrographischen Messungen waren nicht mehr als 2% des Hb im Höchstfalle während der Reaktion zu Hämochromogen verwandelt.

5. Die mit der Methode erhaltenen Ergebnisse waren konstant. Sie schwankten mit p_H, Temperatur und O_2-Sättigung genau in der für die Carbaminoverbindung erwarteten Weise. Sie waren ferner von derselben Größenordnung wie die Werte von *Meldrum* und *Roughton*, deren Methode von *Groscurth* und *Havemann* anerkannt wird.

Wir müssen daher daran festhalten, daß die Methode von *Margaria* und *Green* und von *Groscurth* und *Havemann* für die Bestimmung der CO_2, die als Carbaminoverbindung an Hb gebunden ist, unbrauchbar ist. Andererseits ist die Brauchbarkeit der Methode von *Ferguson* und *Roughton* für quantitative Zwecke durch die Bemerkungen von *Groscurth* und *Havemann* nicht widerlegt.

Literatur.

1) *Margaria* u. *Green*, J. of biol. Chem. **102**, 611, 1933. — 2) *Groscurth* u. *Havemann*, diese Zeitschr. **279**, 300, 1935. — 3) *Roughton*, Physiol. Rev. **15**, 241, 1935. — 4) *Cohn* u. *Prentiss*, J. of gen. Physiol. **8**, 619, 1927. — 5) *Adaèr* u. *Adair*, Biochem. J. **28**, 190 u. 1230, 1934. — 6) *Meldrum* u. *Roughton*, J. of Physiol. **80**, 143, 1933. — 7) *Ferguson* u. *Roughton*, ebenda **83**, 68 u. 87, 1935.

Entgegnung auf die vorstehende Bemerkung F. J. W. Roughtons zu unserer Arbeit über Carb-Hämoglobin.

Von

G. Groscurth und **R. Havemann.**

(Aus der IV. Medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1936.)

Zu 1.: Die unseren Berechnungen zugrunde gelegte Gleichung: $p_{K_1'} = 6{,}33 - 0{,}5\sqrt{\mu}$, in der die Abhängigkeit der Aktivität des HCO_3'-Ions von der Ionenstärke zum Ausdruck kommt, wurde von uns ohne Einführung einer „Annahme" über die Beeinflussung der HCO_3-Aktivität durch das Hämoglobin angewendet. Aus den Messungen von *Stadie* und *Sundermann* (1), *Margaria* (2), *Stadie* und *Hawes* (3) und *Stadie* und *O'Brien* (4) geht trotz teilweise andersartiger Deutung durch die Autoren folgendes eindeutig hervor:

1. Eine Beeinflussung der Aktivität des Cl'-Ions durch Hämoglobin wurde nicht beobachtet. Dieses Ergebnis wurde gewonnen aus Messungen des Dampfdrucks, der Gefrierpunktserniedrigung und des osmotischen Druckes, die in Gegenwart von Hämoglobin die gleichen Werte ergaben wie in reinen, wässerigen Lösungen von Natriumchlorid gleicher Konzentration.

2. Messungen über die Beeinflussung der Aktivität des HCO_3'-Ions durch Hb ergaben, soweit nicht genügend Variable dieses Systems gemessen wurden (z. B. die osmotischen Messungen von *Stadie* und *Hawes* und *Stadie* und *O'Brien*), Werte, die man *entweder* durch einen Einfluß des Hb auf die Aktivität der HCO_3'-Ionen *oder* durch die Bindung von CO_2 an das Hämoglobinmolekül erklären konnte. *Stadie* und *O'Brien* schrieben hierzu: „So nahmen *Stadie* und *Hawes* an, daß Hb—CO_2 Null ist und behaupten, daß ihre Versuche eine Aktivitätsminderung des Hämoglobins gegenüber dem Bicarbonation zeigen. Sie geben allerdings zu, daß, wenn das Vorkommen des Carbhämoglobins später nachgewiesen würde, ihre Berechnung teilweise modifiziert werden müßte." Dieser Nachweis wurde allerdings inzwischen mit Hilfe einer Anzahl voneinander unabhängiger Methoden erbracht (5).

Messungen, wie sie *Margaria* (l. c.) ausführte, in denen genügend Variable des Systems bestimmt wurden, ergaben mit Sicherheit auch aus nicht elektrometrischen Messungen, daß Hämoglobin die Aktivität des Bicarbonations nicht beeinflußt, sondern daß CO_2 als Carbhämoglobin an das Hämoglobin direkt gebunden wird.

Diese zunächst überraschende Beobachtung, daß die Aktivitäten kleiner Ionen durch Proteine *nicht* beeinflußt werden, steht jedoch nicht einmal im Widerspruch zur *Debye-Hückel*schen Theorie, da deren Voraussetzungen hier nicht erfüllt sind: Die Ausbildung von Schwärmen von Proteinionen um einzelne kleine Ionen, wodurch deren Aktivität herabgesetzt werden sollte, ist wegen der Größe der Proteinmoleküle unvorstellbar. [Zudem muß die Reichweite der elektrostatischen Kräfte, die von den dissoziierten Gruppen der Proteinmoleküle ausgehen, wegen des Polypolcharakters sehr klein sein (Abfall mit der vierten bis fünften Potenz).]

Unverständlich erschien uns darum zunächst die Mitteilung *Roughtons*, *Margaria* und *Green* (6) hätten in ihren Berechnungen angenommen, daß Hb als einwertiger Elektrolyt auf die Aktivität der Bicarbonationen einwirke. Nach *Roughton* (7) hätten *Margaria* und *Green* bei ihren Versuchen die Ionenstärke folgendermaßen berechnet:

„*Margaria* and *Green* assumed that it was applicable in hemoglobin solutions, the contribution of the hemoglobin to the ionic strenght being taken as equal to that by sodium ions of conzentration electrochemically equivalent to that of the hemoglobin. Thus, e. g., in experiment 7 of their table 2:

The solution contained Hb = 0.016 M, $Na^{\cdot}$ = 0.032 M, Cl' = 0,0053 M. The Hb is electrochemically equivalent to

$$[Na] = 0.032 - 0.0053 = 0.0267 \text{ M.}$$

The ionic strength then = $\frac{1}{2} \Sigma c v^2 = \frac{1}{2} (0.032 \times 1^2 + 0.0053 \times 1^2 + 0.0267 \times 1^2) = 0.032$."

Unter Zugrundelegung dieser von *Roughton* berechneten Ionenstärke 0,032 ergibt sich tatsächlich zufällig derselbe Wert, wie ihn *Margaria* und *Green* nach ihrer Berechnung in ihrer Arbeit angeben. Selbstverständlich haben *Margaria* und *Green nicht* so gerechnet, wie *Roughton*. *Roughton* hat *anscheinend nicht* beachtet, daß man zur Berechnung der Ionenstärke über *sämtliche* anwesenden Ionen — *außer* den Hb-Ionen — summieren muß, demnach also auch die Bicarbonationen mitberücksichtigen muß. Die pk'_1-Werte, die *Margaria* und *Green* in den einzelnen Tabellen angeben, sind im allgemeinen Mittelwerte oder beziehen sich auf solche Bicarbonatkonzentrationen, bei denen den Autoren besonders an einem exakten pk'_1 lag, sofern nicht eine allzu große Schwankung der Bicarbonationenkonzentration innerhalb des Versuchs sie veranlaßte, die Schwankungsgrenzen von pk'_1 anzugeben, wie in den Experimenten 1 und 4 der Tabelle II auf S. 618. In dem von *Roughton* angeführten Experiment 7 von *Margaria* und *Green* errechnet sich die Ionenstärke aus folgenden Werten:

$[HCO'_3]$ =	etwa 0,0200
$[Cl']$ =	0,0053
$[Na^{\cdot}]$ =	0,0320
$\Sigma c v^2$ =	0,0573
$\frac{1}{2} \Sigma c v^2$ =	0,0287

Hieraus ergibt sich der Wert: $pk'_1 = 6{,}24$, wie bei *Margaria* und *Green*.

Cohn und *Prentiss* (8), die *Roughton* außerdem gegen uns anführt, haben nicht den Einfluß des Hb auf die Aktivität kleiner Ionen, sondern den Einfluß kleiner Ionen auf die Löslichkeit des CO—Hb untersucht und fanden dabei eine Abhängigkeit von der Ionenstärke der kleinen Ionen, die sich durch eine Formel ausdrücken läßt, wie sie auch für die Löslichkeit 2—2-wertiger bzw. 1—3-wertiger Elektrolyte angewendet wird. Demnach hat diese Untersuchung keine Beziehung zur vorliegenden Frage.

Zu 2.: Es ist selbstverständlich, daß Messungen der Menge an „nichtionogen" gebundener CO_2 über die Art der Bindung zunächst nichts aussagen können und somit die Summe sämtlicher vorhandenen Bindungsformen ergeben. Wenn die Messungen richtig sind, können ihre Ergebnisse darum weder zu hoch noch zu niedrig sein. Um uns über die Art der Bindung Aufschluß zu verschaffen, haben wir die Abhängigkeit der an Hämoglobin gebundenen Menge CO_2 vom p_H untersucht. Unter Zugrundelegung der

gefundenen Werte ergab sich die von uns dargelegte Möglichkeit der Deutung (9).

Das Beweismaterial, das *Roughton* für eine Nicht-Carbaminobindungsform der CO_2 an das Hb (y-bound), die neben der Carbaminoform existieren soll, angeführt hat, stützt sich auf folgende Beobachtungen:

1. Das Blut gewisser tropischer Sumpffische bindet nach *Willmer* (10) bei p_H 6,7 so erhebliche Mengen CO_2, daß sie nur durch eine teilweise Bindung der CO_2 an das Hämoglobin erklärt werden können.

Unseres Erachtens besteht kein Grund, anzunehmen, daß an diesem Fischhämoglobin die CO_2-Bindung prinzipiell anders sein sollte. Wir ziehen es vor, anzunehmen, daß die Bindung hier von einer entsprechend schwächer dissoziierten Aminogruppe übernommen wird. (pk_{NH_2} = etwa 7,5 bis 8.)

2. führt *Roughton* die mittels elektrochemischer Methoden bei niedrigen CO_2-Drucken und p_H-Werten von *Dill*, *Forbes* und *Henderson* (11) beobachteten großen Abweichungen von der *Henderson-Hasselbalch*schen Gleichung für die Annahme des y-bound an.

Rechnet man den Einfluß kleiner Mengen Hb—CO_2 bei kleinen CO_2-Drucken und einem p_H-Wert von 6,9 auf diese Abweichung von der *Hasselbalch*schen Gleichung aus, so ergibt z. B. bei nur 0,5 Millimol Hb—CO_2 pro Liter, einem CO_2-Druck von 0,5 mm Hg und einem wirklichen p_H von 6,9 die *Hasselbalch*sche Gleichung einen p_H-Wert von 7,7, also eine sehr erhebliche Abweichung. Hiernach stehen auch diese Messungen nicht in Widerspruch zu unserer Theorie der Carbaminobindung.

Die Höhe unserer Werte steht zu den bisher mitgeteilten bei Berücksichtigung von p_H und CO_2-Druck nicht in Widerspruch. Gegen die Methode von *Ferguson* und *Roughton*, die wesentlich niedrigere Werte lieferte, sprechen ungewöhnliche experimentelle und theoretische Schwierigkeiten, über die sich *Roughton* (7) kürzlich in seinem zusammenfassenden Bericht in den Physiological Reviews selbst folgendermaßen äußerte:

„*Ferguson* and *Roughton* were unable to overcome these difficulties completely ... The upshot of their work was to show that in hemoglobin solutions equilibrated with CO_2 there is an appreciable amount of bound CO_2 which cannot be precipitated by barium at alkaline p_H ...". Wir haben in dem von *Roughton* zitierten Satz unserer Arbeit, „... daß diesen Messungen kaum mehr als eine qualitative Bedeutung zukommt", nichts anderes aussprechen wollen.

Literatur.

1) *Stadie* u. *Sunderman*, J. of biol. Chem. **91**, 227, 1931. — 2) *Margaria*, J. of Physiol. **72**, 7, 1931; **73**, 311, 1931; Boll. Soc. ital. biol. sper. **7**, 425, 1932. — 3) *Stadie* u. *Haves*, J. of biol. Chem. **77**, 265, 1928. — 4) *Stadie* u. *O'Brien*, diese Zeitschr. **237**, 290, 1931. — 5) *Meldrum* u. *Roughton*, J. of Physiol. **80**, 143, 1933; *Henriques*, Ergebn. d. Physiol. **28**, 625, 1929; diese Zeitschr. **243**, 241, 1931; **260**, 58, 1933. — 6) *Margaria* u. *Green*, J. of biol. Chem. **102**, 611, 1933. — 7) *Roughton*, Physiol. Rev. **15**, 241, 1935. — 8) *Cohn* u. *Prentiss*, J. of gen. Physiol. **8**, 619, 1927. — 9) *Groscurth* u. *Havemann*, diese Zeitschr. **279**, 300, 1935. — 10) *Willmer*, J. exper. Biol. **11**, 283, 1934. — 11) *Dill*, *Forbes* u. *Henderson*, J. of biol. Chem. **109**, 27, 1934.

Gärungs-Co-Ferment.

(Kurze Mitteilung.)

Von

Otto Warburg und **Walter Christian.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Zellphysiologie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 13. März 1936.)

Gewinnung des Gärungs-Co-Ferments.

Das Gemisch der Phosphorsäureester, das man aus roten Pferdeblutzellen durch Extraktion mit Aceton und Fraktionierung mit Mercuriacetat gewinnt[1], enthält nicht nur wasserstoffübertragendes Co-Ferment, sondern, wie wir gefunden haben, ebensoviel Gärungs-Co-Ferment. Wir trennen die beiden Co-Fermente nach folgendem Prinzip:

Das Gemisch der Phosphorsäureester wird in Wasser gelöst. Mit Bariumacetat und Baryt werden die in Wasser schwer löslichen Barytsalze (der phosphorylierten Glycerinsäure und der höher phosphorylierten Adenylsäuren) entfernt. Aus der Mutterlauge fällt Alkohol das Bariumsalz des wasserstoffübertragenden Co-Ferments, während das Bariumsalz des Gärungs-Co-Ferments in Lösung bleibt. Die alkoholische Lösung wird durch Vakuumdestillation von der Hauptmenge des Alkohols befreit, aus der wässerigen Lösung fällt Mercuriacetat das Gärungs-Co-Ferment. Zur Reinigung löst man das freie Co-Ferment in salzsaurem Methanol, fällt es mit Essigester, löst dann in wässeriger Essigsäure, versetzt mit Bleiacetat und fraktioniert mit Alkohol. Aus derjenigen Bleisalzfraktion, die mit viel Alkohol fällt, wird das freie Co-Ferment durch Entbleien mit Schwefelwasserstoff und Fällen mit Aceton gewonnen.

Das so isolierte Gärungs-Co-Ferment enthielt keine Spur des wasserstoffübertragenden Co-Ferments.

Gärtest.

Das Gärungs-Co-Ferment wurde mit Hilfe eines Tests isoliert, bei dem kristalloide und kolloide Substanzen (Proteine aus Hefe) zusammenwirken. Ohne Gärungs-Co-Ferment ist das System reaktionslos. Zusatz von Gärungs-Co-Ferment bewirkt, daß (anaerob) Kohlensäure entwickelt wird, und zwar erzeugt $^1/_{100}$ mg unseres bisher reinsten Co-Ferments bei 20^0 einen Ausschlag von einigen cmm CO_2 pro Minute.

---

[1] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **282**, 157, 1935.

Adenin und Nicotinsäureamid.

Gärungs-Co-Ferment aus roten Blutzellen enthält 13 % Stickstoff (*Dumas*) und etwa 8 % Phosphor. Bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure werden Adenin und Nicotinsäureamid frei.

Aus 565 mg Co-Ferment wurden z. B. erhalten[1]:

Adenin. 275 mg Adeninpikrat = 102 mg Adenin. Das Adeninpikrat zersetzte sich bei 291° (unkorr.), gleichzeitig mit einer Probe reinen Adeninpikrats. Bei der Stickstoffbestimmung nach *Dumas* fand *W. Lüttgens*: 3,216 mg; 0,845 ccm N [20°, 757 mm], 30,5 % N, berechnet für Adeninpikrat 30,8 % N.

Nicotinsäureamid. 245 mg rohes Pikrolonat = 77,5 mg Nicotinsäureamid. Durch Umkristallisieren aus Aceton wurden daraus Nadeln erhalten, die sich bei etwa 215° zersetzten. Aus diesen wurde Nicotinsäureamid-Chlorhydrat dargestellt. Bei der Analyse fand *W. Lüttgens*:

4,523 mg; 7,495 mg CO_2; 1,827 mg H_2O.
4,521 mg; 0,675 ccm N [21°; 758 mm].
5,069 mg; 3,16 ccm n/100 NH_3 bei einstündigem Erhitzen auf 100° mit 33 % KOH.

	C	H	N	Amid-N H_3
$(C_6H_6N_2O)HCl$ ber. . .	45,4	4,42	17,6	10,7
gef. . .	45,2	4,52	17,3	10,6

Das Pikrolonat, das beim Versetzen des Amylalkoholextraktes mit Pikrolonsäure fällt, ist fast analysenrein, wenn man nicht $6^1/_2$ Stunden (alte Vorschrift), sondern nur 2 Stunden mit n/10 H_2SO_4 bei 100° hydrolysiert. Das Rohprodukt wird mit geringem Verlust aus heißem Wasser umkristallisiert (haarförmige Nadeln) und zur Analyse 2 Stunden im Hochvakuum bei 60° getrocknet. (Einwaage zur Analyse unter Vorsichtsmaßregeln, weil die Substanz hygroskopisch ist.) *W. Lüttgens* fand:

4,348 mg 8,020 mg CO_2; 1,440 mg H_2O,
4,056 „ 0,749 ccm N [19,5°; 761 mm].

	C	H	N
Pikrolonat des Nicotinsäureamids			
$C_{16}H_{14}N_6O_6$ ber.	49,8	3,64	21,8
gef.	50,3	3,71	21,6

Reversible und irreversible Hydrierung.

Bei der totalen (irreversiblen) Hydrierung des Gärungs-Co-Ferments mit Platin und Wasserstoff (p_H 9,5) gibt das Gärungs-Co-Ferment einen Hydrierwert von etwa 100 cmm Wasserstoff pro mg. Bei der reversiblen Hydrierung mit Hydrosulfit addiert das Gärungs-Co-Ferment 2 Atome Wasserstoff.

Bei beiden Hydrierungen verhält sich also das Gärungs-Co-Ferment wie das wasserstoffübertragende Co-Ferment.

[1] Vorschrift vgl. diese Zeitschr. **282**, 157, 1935, insbesondere S. 182.

Verwandtschaft mit dem wasserstoffübertragenden Co-Ferment.

Gärungs-Co-Ferment und wasserstoffübertragendes Co-Ferment unterscheiden sich *chemisch* wesentlich durch den Gehalt an Phosphorsäure, von der das wasserstoffübertragende Co-Ferment *mehr* enthält (13 % P gegen 8 % P).

Die Proteine, durch die die beiden Co-Fermente zu Fermenten werden, sind verschieden.

Co-Zymase.

Nicotinsäureamid ist zuerst aus wasserstoffübertragendem Co-Ferment isoliert worden[1]. Nach der gleichen Vorschrift versuchten 1 Jahr später[2] *v. Euler* und Mitarbeiter Nicotinsäureamid aus Co-Zymase zu isolieren. Sie erhielten ein Pikrolonat von der Zusammensetzung C 49,6 %, H 4,13 %, N 20,44 %, dessen Analyse also nicht auf Nicotinsäureamid-Pikrolonat stimmte.

Der Beweis, daß auch Gärungs-Co-Ferment einen Pyridinkörper enthält, ist durch die vorliegende Arbeit — durch die Elementaranalyse des aus Gärungs-Co-Ferment isolierten Nicotinsäureamid-Chlorhydrats und seines Pikrolonats — erbracht worden.

---

[1] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **275**, 212, 1934; **275**, 464, 1935. — [2] *H. v. Euler, H. Albers, F. Schlenk*, H.-S. **237**, 1, 1935 (November 1935).

Der isoelektrische Punkt des Fibrinogens.

Von

Eskil Kylin und **Friedrich Paulsen.**

(Aus der inneren Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses in Jönköping, Schweden.)

(Eingegangen am 22. Februar 1936.)

Ausgangspunkt.

Im Rahmen fortlaufender Untersuchungen über die Eiweißkörper des Blutes wurde im Gegensatz zu den meisten Angaben der Literatur über den isoelektrischen Punkt des Fibrinogens gefunden, daß ein Teil des Fibrinogens bei der Überführung unveränderten Plasmas einen positiven Ladungssinn zeigt [*Kylin* und *Paulsen* (1)]. Damit ist die Möglichkeit gegeben, Fibrinogen in seinem ursprünglichen Solzustand zu isolieren. Für die physiologische Theorie bedeutet der Befund eines Fibrinogens mit einer bei physiologischer H^+-Konzentration relativ starken positiven Ladung einen neuen Ausgangspunkt für eine ganze Reihe von Fragen. Dieser wird sich, wie wir später zu zeigen hoffen, z. B. für die Theorie der Senkungsgeschwindigkeit, der Blutgerinnung, der Hämolyse usw. als fruchtbar erweisen.

Zunächst aber war die Aufgabe gegeben, die Größe dieser beim p_H des Blutes positiven Ladung des Fibrinogens festzustellen. Das bedeutete die Bestimmung seines isoelektrischen Punktes. Nun gibt es schon eine nicht unbedeutende Zahl von Arbeiten, die eine solche Bestimmung zum Ziele hatten. Zusammenstellungen der bisherigen Resultate findet man bei *Mainzer* (2) und *Klinke* (3). Es dürfte nicht leicht sein, auf einem anderen Gebiet der Physikochemie ein Gegenbeispiel derartiger Widersprüche zu finden, wie hier in bezug auf den isoelektrischen Punkt des Fibrinogens. Zwischen dem niedrigsten Wert von *Farkas* und *Groak* (4) bei p_H 3,9 und dem höchsten *Rossiers* (5) bei 12,5 wird an den verschiedensten Stellen dieses großen p_H-Bereichs der isoelektrische Punkt des Fibrinogens angegeben. Allerdings hat die weitaus überwiegende Mehrzahl der Untersucher ihn in dem wesentlich kleineren Bereich zwischen p_H 4,4 und 5,2 gefunden.

Methodisches.

Einen großen Teil dieser Unterschiede kann man wohl auf methodische Verschiedenheiten zurückführen, zum Teil, wie *Mainzer* (2) angibt, auf verschiedene Salzkonzentration, zum Teil vielleicht auch auf verschiedene Eiweißkonzentration. Aber selbst dann bleibt ein großer Teil von Differenzen übrig, der durch diese beiden Faktoren nicht zu

erklären ist. Welche Bedeutung die Bestimmungsmethode für diese Differenzen und damit für den Wert der Messungen überhaupt hat, werden wir im Zusammenhang mit der Darstellung unserer eigenen Methodik erörtern. Die verschiedenen Bestimmungsmethoden liefern sicherlich nicht Ergebnisse, die man ohne weiteres vergleichen darf. Aber noch wichtiger als diese Unsicherheitsfaktoren für die Zuverlässigkeit der Messung ist die Darstellungsweise der untersuchten Eiweißlösungen.

Darstellungsmethodik. „Durch die Isolierung und Reinigung werden die Eiweißkörper aus jenen physikalisch-chemischen Bedingungen entfernt, die physiologischerweise ihren genuinen oder nativen Charakter gewährleisten. Sie erscheinen nunmehr labiler" [*Pauli* (21)]. Jede Isolierung und Reinigung ist ein Schritt zur Denaturierung. Und eine Denaturierung ist eine irreversible Änderung vieler physikochemischer Eigenschaften auch dann, wenn das denaturierte Eiweiß in Lösung bleibt oder wieder in den Solzustand überführt werden kann. Diese Änderungen betreffen seine optischen Eigenschaften, seine molekulare Konstitution — wahrscheinlich, indem sie Nebenvalenzbindungen lösen —, Viskosität, osmotischen Druck, Löslichkeit und, was uns hier vor allem angeht, seine H^+- und OH^--Bindungsfähigkeit.

Wenn man nun die Darstellungsweisen der bisherigen Untersucher betrachtet, so sieht man in der Übersicht von *Mainzer* (2), daß alle, mit Ausnahme von *Rossier* (5), das zu untersuchende Fibrinogensol nach der Methode *Hammarstens* oder einer ähnlichen Salzfällungsmethode hergestellt haben. *Rossier*, der als einziger mit nativem Plasma arbeitete, ist auch der einzige, der die isoelektrische Reaktion im Gegensatz zu allen anderen oberhalb des Neutralpunktes findet. Wir werden seine Resultate weiter unten im Vergleich mit unseren eigenen behandeln. Die Resultate von *Kugelmass* (6), der ebenso wie *Rossier* den isoelektrischen Punkt des Fibrinogens im alkalischen Bereich bei p_H 8 angibt, können hier wegen Mangels an notwendigen Bestimmungsdaten nicht verwertet werden. — Alle anderen Untersucher arbeiteten jedoch mit mehrfach salzgefälltem und wieder gelöstem „genuinem" Fibrinogen.

Hier muß ein Wort zur Terminologie gesagt werden. Die Ausdrücke „nativ" und „genuin" werden nicht von allen Autoren in der gleichen Bedeutung angewandt. Im Gegensatz zu der wissenschaftlich ausreichend klaren Definition des Begriffes „denaturiert" sind „nativ" oder „genuin" konventionelle Begriffe, deren Inhalt mehr per exclusionem als durch eigene Kriterien bestimmt ist; eben nur durch die Gegenüberstellung gegen den Begriff „denaturiert".

In den Diskussionen der letzten Jahre hat sich nun immer deutlicher herausgestellt, daß dies nicht mehr ausreicht. Es geht wohl kaum an, daß man ein Protein, das nach mehrfacher Salzumfällung wesentliche Änderungen seiner ursprünglichen, im biologischen Zusammenhang geltenden, physikochemischen Eigenschaften erlitten hat, und ein anderes Protein, das seinen

ursprünglichen Solzustand niemals verlassen hat, mit dem gleichen Ausdruck „nativ" oder „genuin" bezeichnet. Wir folgen daher dem Beispiel von *Kylin* (8), *Grönwall* (10) und *Bennhold* (9) und bezeichnen mit dem Ausdruck „nativ" nur solche Proteine, die ihre ursprüngliche, kolloidale Zustandsform nicht verlassen haben. So bleibt der Begriff „genuin" zur Bezeichnung der übrigen nicht denaturierten Eiweiße.

Aus dieser Definition ergibt sich, daß *Rossier* (5) als einziger die isoelektrische Reaktion *nativen* Fibrinogens bestimmt hat; wobei allerdings hinzuzufügen ist, daß er zwar mit nativem Eiweiß, aber nicht mit reinem *und* nativem Fibrinogen gearbeitet hat. Denn die Isolierung des nativen Fibrinogensols ist erst durch *Kylin* und *Paulsen* möglich geworden, die fanden, daß Fibrinogen bei der physiologischen Reaktion des Blutes positiv geladen ist.

Der Umstand, daß wir an einer durch elektrophoretische Schichtung gewonnenen Fibrinogenlösung den isoelektrischen Punkt zu bestimmen unternahmen, *unterscheidet unser Verfahren prinzipiell von den bisherigen Bestimmungsversuchen.* In welchem Ausmaße das Herauslösen einer Substanz aus dem Organismus eine Veränderung hervorruft, ist unbekannt. Die Arbeiten von *The Svedberg* und *Sjögren* (11) haben solche Veränderungen in bezug auf die Darstellung des Lactalbumins und des Ovalbumins und zwar im Sinne einer Kondensation der nativen Form wahrscheinlich gemacht. Was für diese beiden Proteine gilt, das dürfte wahrscheinlich in erhöhtem Maße für das Fibrinogen gelten.

Der biologische Übergang des Fibrinogensols in die Gelform, Fibrin, d. h. die Gerinnung, ist ein so komplizierter und weitgehend unbekannter Vorgang, daß es durchaus nicht ohne weiteres möglich erscheint, ihn mit den übrigen Gelbildungen zu vergleichen. Es ist keineswegs unbedenklich, das durch Kochsalzsättigung gefällte, grobdisperse Bluteiweiß mit der bei der normalen Blutgerinnung auftretenden Gelsubstanz zu identifizieren. Bei der Kochsalzsättigung werden ohne Zweifel auch Globuline mitbetroffen, die bei der Blutgerinnung kein Gel bilden. Hierzu kommt noch die außerordentliche Empfindlichkeit aller Globuline und auch des Fibrinogens selbst gegenüber Salzen, die nahezu als Charakteristikum der Globuline gelten kann und die eine Änderung des Fibrinogenmoleküls durch die Salzfällung möglich erscheinen läßt. Nach unseren Untersuchungen möchten wir annehmen, daß eine solche Veränderung in der Tat vor sich geht, und zwar in dem Sinne, daß die Salzfällung den betreffenden Proteinen erst eine gewisse Einheitlichkeit verleiht, die ihnen unter biologischen Bedingungen nicht zukommt. Weiter unten werden wir zeigen, inwieweit unsere Resultate diese Anschauung stützen können. Auch eine ganze Reihe von Arbeiten neueren Datums teilen bezüglich der anderen Proteine des Blutes gleichartige Beobachtungen mit [*Kylin* (12), *Grönwall* (13), *Mutzenbecher* (14), *Bennhold* (9)].

Es muß besonders auf die Arbeit *Mutzenbechers* aus dem Institut *Svedbergs* hingewiesen werden. Er wies mit der Methode der Ultrazentrifuge den Einfluß der Darstellungsweisen der Proteinfraktionen des Blutes auf ihr Molekulargewicht nach. Salze wirken nach ihm sowohl spaltend als auch aggregierend auf die Eiweißmoleküle, jedenfalls in den für Fällungen notwendigen Konzentrationen. Die Umkristallisierung beeinflußt aber sehr wahrscheinlich nicht allein die Dispersität der Proteine, sondern auch die anderen, bei der Denaturierung veränderten Eigenschaften weniger stark. Eine weitere Schwäche der Isolierung mittels Salzfällung beruht in der erforderlichen langen Zeitdauer bei der Reinigung durch Dialyse. Danach darf wohl mit Recht angenommen werden, daß Folgerungen für die Biologie aus solchen Untersuchungen, die an umkristallisierten und dialysierten Fibrinogenlösungen unternommen wurden, nur mit großer Einschränkung gezogen werden dürfen.

Die Methode der kataphoretischen Entmischung vermeidet derart tiefgehende Eingriffe in die Struktur des Fibrinogens. Ihre Nachteile sind anderer Art. Die wesentlichen Nachteile sind folgende: 1. Die Methode ist technisch komplizierter. 2. Es ist eine relativ große Menge Plasma erforderlich. 3. Es ist eine Zeitdauer von 12 bis 30 Stunden nötig, um ausreichende Mengen reinen Fibrinogens zu erhalten. 4. Es ist praktisch unmöglich, aus einer Plasmamenge das Fibrinogen quantitativ zu gewinnen.

Zu 1: Die ersten beiden Nachteile sind äußerer Art und leicht zu überwinden. Es empfiehlt sich z. B., soweit die Fragestellung es gestattet und wenn größere Mengen gebraucht werden, mit Pferdeplasma zu arbeiten, da dieses reich an isolierbarem Fibrinogen ist.

Zu 2: Die zunächst kompliziertere Methode der kataphoretischen Entmischung ist wesentlich vereinfacht worden durch *Theorell* (7), *Bennhold* (9), *Kylin* und *Paulsen* (1).

Zu 3: Die Zeitdauer ist geringer als die für eine ausreichende Dialyse notwendige.

Zu 4: Eine Beseitigung dieses Nachteils erscheint zur Zeit nicht möglich. Bei der Beurteilung der Ergebnisse aus Untersuchungen an kataphoretisch entmischtem Fibrinogen muß berücksichtigt werden, daß es sich nur um eine durch ihre verschiedene Ladung abgrenzbare Fraktion des Fibrinogens handeln kann.

Darstellung des Fibrinogens durch kataphoretische Entmischung.

Ausgangsmaterial war 0,1 %iges Lithiumoxalatplasma von Pferd oder Mensch. Nach fünfstündigem Stehen des Blutes wurde das Plasma durch Zentrifugieren abgetrennt und unmittelbar darauf dem elektrischen Felde ausgesetzt. Angewandt wurde das offene U-Rohr und zwar in zwei Größen: 1. Elektrodenabstand 91 cm, Mittelflüssigkeitskapazität 135 ccm, durchschnittliche Spannung an den Enden des elektrischen Feldes 70 bis 90 Volt. Bei Anwendung dieses Apparates waren mindestens 12 Stunden notwendig, um eine reine und ausreichend große Fibrinogenschicht zu gewinnen. 2. Spannung 100 bis 150 Volt, Elektrodenabstand 71 cm, Mittelflüssigkeitskapazität 50 ccm. *Schon nach 8 Stunden konnte Fibrinogen entnommen werden.* Seitenflüssigkeit war in allen Fällen 0,85 %ige NaCl-Lösung.

Unpolarisierbare Cu-, $CuSO_4$-, KCl-Agar-, 10% KCl-, KCl-Agar-Elektroden. Als Kathodenschenkel wurde die Seite des tieferliegenden, die Grenzschicht bildenden Hahns gewählt, der selbst mit Plasma gefüllt war, so daß die Wanderung des Kathodenspiegels von der O-Linie an beobachtet werden konnte.

Die Fibrinogenschicht war immer an ihrer durchsichtig weißen Färbung gut zu erkennen und gegen die undurchsichtig weiße Globulinschicht gut abgrenzbar. *Über dem oberen sichtbaren Spiegel der Fibrinogensäule wandert mit erheblich größerer Geschwindigkeit noch ein unsichtbares Fibrinogen* in geringer Konzentration. Unsere Bestimmungen wurden an jeder der beiden alkalischen Fraktionen für sich vorgenommen. *Die schneller wandernde, unsichtbare Fraktion wurde als Fibrinogen A, die langsamer wandernde, durch einen weißen Spiegel abgegrenzte als Fibrinogen B bezeichnet.*

Abpipettiert wurde mit einer Kapillarsaugpipette, nur die letzten 10 mm der Fibrinogensäule wurden schichtweise nach *Bennhold* (9) entnommen und das Auftreten von Globulinen auf folgende Weise geprüft: 0,5 ccm Flüssigkeitsprobe werden mit 0,5 ccm 56%ig gesättigtem $(NH_4)_2SO_4$ versetzt, kräftig geschüttelt und nach 20 Minuten filtriert; das Filtrat wird mit Sulfosalicylsäure geprüft. Die Globulinbeimengung begann fast regelmäßig an der Ausgangslinie.

Eine Schwierigkeit war, daß das Fibrinogen unter diesen Bedingungen manchmal am Kathodenhahn während des Versuchs ausfiel (offenbar auf Grund minimaler, lokaler p_H-Verschiebungen, vielleicht durch Verunreinigungen von seiten der zum Schmieren des Hahnes benutzten Vaseline). Dabei entstand eine Fibrinogengallerte, die immer nur den Kathodenschenkel des U-Rohres erfüllte.

Das so gewonnene Fibrinogen lag also immer in 0,85%iger NaCl-Lösung vor. Auf Reinigung durch Dialyse wurde aus den oben angegebenen Gründen verzichtet. Da das native Fibrinogen sich als sehr empfindlich erwies, wurde es gleich nach der Entnahme verarbeitet. Wenn sich eine Gallerte gebildet hatte, wurde es nicht mehr angewandt, auch wenn die thixotrope Gallerte durch Schütteln wieder in Lösung zu bringen war.

Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Fibrinogens.

Allgemeines. Es sind drei verschiedene Wege möglich, den isoelektrischen Punkt zu bestimmen: Bestimmung des kataphoretischen Umladepunktes, des Fällungsoptimums und die elektrometrische Titration. Wie wir einleitend sagten, sind die Resultate dieser drei Methoden nicht ohne weiteres vergleichbar. Aber eine Reihe von Unsicherheitsfaktoren ist ihnen allen gemeinsam.

Auf die Frage der Einheitlichkeit des Substrats soll hier nicht eingegangen werden. Es sei nur erwähnt, wie sehr Komplexbildungen der Eiweiße die Schärfe und die Lage des isoelektrischen Punktes beeinflussen,

und daß es einen gut begrenzten Bereich chemischer Stabilität der Proteine zwischen p_H 3,5 und 11,5 gibt. Darüber hinaus beginnen die Eiweißmoleküle zu zerfallen [*Ettisch* und *Schulz* (15), *Johnson* und *Wormall* (16), *Mutzenbecher* (14)].

Wie wichtig es ist, eine physiologische und konstante Neutralsalzkonzentration einzuhalten, geht aus der Beobachtung *Mainzers* (2) hervor, daß steigende Neutralsalzkonzentration das Stabilitätsminimum nach der sauren Seite hin verschiebt; eine Beobachtung, die wir gelegentlich bestätigen konnten. Dagegen konnten wir niemals eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch verschiedene Eiweißkonzentration feststellen. Diese Einwände richten sich gegen die verschiedenen Methoden der Bestimmung des isoelektrischen Punktes im gleichen Maße. Daneben hat jede Methode ihre besonderen Vorzüge und Nachteile.

Kataphoretische Methoden. Es sind mehrere Bestimmungen des kataphoretischen Umladepunktes an den Proteinen des Blutes vorgenommen worden. Soweit sie natives Eiweiß betrafen, wurden sie mit Ausnahme derjenigen von *Rossier* (5), *Luchsinger* (17) und *Vlés* (18) an Serum vorgenommen. Übereinstimmend lagen die Umladepunkte des Serums im sauren Bereich. Dagegen fanden die drei genannten Autoren im Plasma außer diesen noch zwei im Alkalischen liegende Punkte; außer einem sehr stabilen bei p_H 5,5 und einem anderen unter p_H 4 fanden sie nämlich noch einen nahe unter p_H 12,5 und einen bei p_H 9. Wenn man die gute Übereinstimmung des ersten Wertes mit allen Angaben über das Globulin und den des zweiten Wertes bei p_H 4 mit dem von *Kylin* (12) an nativem Albumin gefundenen berücksichtigt, so bleibt für die alkalischen Werte nur das Fibrinogen übrig. Sie würden mit den bei der Elektrophorese des Plasmas gefundenen zwei basischen Fraktionen des Fibrinogens einigermaßen übereinstimmen. Auch *De Waele* findet mittels Kataphorese und Alkoholflockung den isoelektrischen Punkt des Fibrinogens ungefähr am Neutralpunkt, bei p_H 6,9.

Fällungsmethoden. In scharfem Widerspruch mit diesen Resultaten stehen die durch Bestimmung des Fällungsmaximums gewonnenen Ergebnisse. Soweit sie an umgefälltem Fibrinogen vorgenommen wurden, liegen sie im sauren Gebiet, zwischen p_H 3,8 und 6,3. Denaturiertes Fibrinogen zeigt Werte an der oberen, ausgesalzenes an der unteren Grenze. Auch eine gewisse Abhängigkeit von der Wahl der Puffer ist bemerkbar. So ist wohl kein Zweifel, daß die extrem niedrigen Werte von *Farkas* und *Groak* (4) unterhalb p_H 4 auf der Anwendung des Citrats als Puffer beruhen, das mit Vorliebe mit dem Proteinmolekül Verbindungen eingeht.

Elektrometrische Titration. Die Methode *Nordbös* (19) beruht darauf, daß das Eiweiß unterhalb des isoelektrischen Punktes als Base Säure bindet, oberhalb als Säure fungiert. Titriert man also eine Säure elektrometrisch, so findet man oberhalb des isoelektrischen Punktes eine stärker saure, unterhalb eine stärker basische Reaktion, gegenüber der Titration einer eiweißfreien Vergleichslösung. Der isoelektrische Punkt soll durch den Schnittpunkt beider Kurven elektrometrischer Titration gegeben sein. *Nordbö* (19) findet auf diese Weise den isoelektrischen Punkt des Fibrinogens bei p_H 5,5. Gegen seine Methode sind sehr schwerwiegende Einwände möglich. Z. B. muß in dem entscheidenden Bereich das Protein nicht gelöst, sondern als feste Phase titriert werden, da es eben hier ausgefallen ist. Theoretisch aber ist ein Vergleich der Kurven proteinfreier und proteinhaltiger Lösungen nur bei gelöstem Protein möglich. Auch praktisch ist die Beurteilung des Schnittpunktes fast gleichgerichteter Kurven außerordentlich schwierig

und läßt große Fehlermöglichkeiten offen. Aus diesen Gründen haben wir auf die Methode der elektrometrischen Titration verzichtet und uns auf Überführungs- und Fällungsversuche beschränkt.

Eigene Bestimmungsmethodik.

Die Überführungsversuche wurden nach den Angaben von *M. Michaelis* (20) vorgenommen. Es wurden kleine offene U-Rohre von 5 mm Durchmesser und 29 cm Elektrodenabstand verwendet. Die Überführungsdauer betrug 1 bis 2 Stunden, die Spannung 180 bis 200 Volt. Die angegebenen Werte der H^+-Konzentration wurden nach Abschluß in der Mittelflüssigkeit mit *Lautenschläger*s Ionometer kontrolliert. Die Differenzen mit den ebenfalls kontrollierten Puffern hielten sich innerhalb der zweiten Dezimale. Die Wanderung des Fibrinogens wurde nach Entnahme der Seitenflüssigkeit mit Sulfosalicyl- und Salpetersäure geprüft. Die letzten 10 mm oberhalb der Ausgangslinie wurden nicht mitverwendet, um den Einfluß einer dialytischen Bewegung des Proteins ausschließen zu können. Auf Grund unserer Darstellungsmethode konnten wir auf den Nachweis des Fibrinogens im gerinnenden System verzichten und infolge der weit größeren Empfindlichkeit dieser beiden allgemeinen Eiweißproben mit kleineren Mengen arbeiten. Wir bestimmten den elektrischen Umladepunkt nicht nach *Michaelis* als arithmetisches Mittel der Zone unklarer Kataphorese, sondern erhielten in jeder einzelnen Überführung durch Entnahme in sechs Schichten und qualitative Differenzierung des Ausfalls der empfindlichen Eiweißproben ein deutliches Bild von der Stärke der anodischen bzw. kathodischen Wanderung. Für eine Serie von Überführungen bei variiertem p_H wurde das gleiche Fibrinogen aus einem einzigen Darstellungsprozeß verwandt. Das war in Anbetracht der geringen Haltbarkeit des Fibrinogensols und des großen in Frage kommenden p_H-Bereichs nur dadurch möglich, daß zwei oder drei Überführungen gleichzeitig in mehreren Apparaten nebeneinander vorgenommen wurden.

Der gleiche Gesichtspunkt wurde auch bei den Fällungsserien beachtet. Zunächst wurde mit der Alkoholflockung gearbeitet, bis sich die Überlegenheit der Hitzefällung für unseren Zweck deutlich herausstellte. Einige Vorversuche mit serienweiser Aussalzung ergaben nicht gleich scharfe Maxima wie die anderen Verfahren. Das von *Grönwall* (10) kürzlich beschriebene Verfahren der Chloroformausschüttelung läßt, abgesehen von seiner Umständlichkeit, dem subjektiven Ermessen Spielraum; und gleichzeitig scheint die Fehlerbreite der Mikrobestimmungen des Proteinstickstoffs eine Beurteilung feiner Differenzen zu erschweren.

Wir erhielten mit Alkohol- und Hitzefällungen recht brauchbare Resultate, wenn wir die Ergebnisse durch die folgenden Zeichen kennzeichnen: — = klar, (—) = unklar, (+) = opaleszent, + = milchig durchsichtig, ++ = milchig undurchsichtig, +++ = fein flockig, ++++ = grob flockig.

Die Fällungsreihen wurden folgendermaßen angesetzt: Zu gleichen Mengen der Fibrinogenlösung wurden meist 2 ccm Pufferlösung zugesetzt und auf etwaigen spontanen Ausfall geachtet. Trat ein solcher nicht ein, so wurde 0,5 ccm 92%iger Alkohol gleichmäßig tropfenweise zugegeben. Um eine von der Reihenfolge des Zusetzens unabhängige Flockungsintensität zu erhalten, wurden zwei Vergleichsreihen vom entgegengesetzten Ende her begonnen. Die Flockungsintensität wurde nach 5 Minuten abgelesen.

Auf dieselbe Weise wurden auch die Reihen für Hitzefällung angesetzt. Die Eiweiß-Puffergemische wurden in gleichmäßig dicke Gläser gefüllt und wurden im Wasserbad unter Temperaturkontrolle und ständiger Beobachtung gleichmäßig erhitzt. Diese Methode erlaubt im gleichen Versuch eine zweimalige Bestimmung des Optimums. Erstens, indem man bei langsamem Erhitzen das Auftreten der ersten Fällung feststellen kann und durch Unterbrechen des Erhitzens oft eine einzige Fällung erhält, während alle anderen Gläser noch klar sind. Bei keinem anderen Fällungsverfahren sind so deutliche Intensitätsunterschiede festzustellen, wie beim Ermitteln des ersten Auftretens der Hitzefällung. Außerdem aber hat man noch die Möglichkeit, alle Gläser gleichmäßig bis zu einer bestimmten Temperatur zu erhitzen und dann die Stärke der Flockung zu vergleichen. Diese beiden Feststellungen kontrollieren einander, wodurch die Hitzefällung zu der überlegenen Fällungsmethode wird.

Vielleicht könnte man gegen diese Fällungsmittel einwenden, daß sie das Fibrinogen erst denaturieren — d. h. die Löslichkeit herabsetzen — und in einem zweiten Teilvorgang danach ausflocken. Da jedoch die Denaturierung ein zeitlicher Vorgang und seine Geschwindigkeit auf das stärkste von der Temperatur abhängig ist, so kann man mit Recht annehmen, daß bei der niedrigliegenden Ausflockungstemperatur des Fibrinogens Denaturierung und Ausflockung im isoelektrischen Punkt zusammenfallen.

Ergebnisse.

A. Unterscheidung zweier basischer Fraktionen.

Im Beginn unserer Versuche, den isoelektrischen Punkt des basischen Fibrinogens zu bestimmen, stießen wir auf die folgenden Schwierigkeiten: Wir erhielten zwar eine Fibrinogenlösung, die den bei der Methodik beschriebenen Kriterien der Reinheit genügte, wenn wir das gesamte kathodenwärts in die Seitenflüssigkeit eingewanderte Protein entnahmen. Wenn wir aber nun dieses Fibrinogensol Überführungs- und Fällungsversuchen unterwarfen, so erhielten wir uneinheitliche, widerspruchsvolle Ergebnisse. So zeigten die elektrischen Überführungen in Pufferlösungen keinen erkennbaren Umladepunkt.

Man sieht, daß bis herauf zu p_H 8 das Fibrinogen wie am Neutralpunkt zur Anode wandert, daß aber von p_H 8,3 an bis zu 12,4 das Fibrinogen nach beiden Richtungen wandert, ohne eine Umladung er-

Tabelle I.

Laufende Nr.	Dauer in Std.	Spannung in Volt	Puffer Veronal : n/10 HCl	p_H	Sulfosalicylprobe					
					Kathode			Anode		
					1	2	3	3	2	1
17	1½	170	6,15 : 3,85	7,6	++	++	+++	—	—	—
18	1	170	7,16 : 2,84	8,0	—	+	+++	—	—	—
19	2	160	8,47 : 1,53	8,3	++	++	+++	++	+	—
20	1½	150	9,08 : 0,92	8,8	++	++	+++	+	—	—
21	2	190	9,74 : 0,76	9,4	++	++	+++	+++	++	++
			m/20 B : n/10 NaOH							
22	1	160	6 : 4	10,0	—	+	++	++	+	—
23	1½	200	4 : 6	12,4	+	+	++	+++	++	+

27. X. 1935. Basisches Fibrinogen (Mensch). Kochsalz: 0,85%, Mittelflüssigkeit: 2 Puffer : 1 Fibrinogen.

kennen zu lassen. Die fehlende Wanderungsrichtung und die ungleichmäßige Stärke des Wanderns zu beiden Polen läßt kein Urteil über den isoelektrischen Punkt zu.

Beim Ansetzen von Fällungsreihen mit dem gesamten Fibrinogen traten zwar verschiedene minder deutliche Flockungsoptima auf. Aber erstens sind es mehrere Optima, zweitens sind sie nicht sehr scharf und drittens sind sie nicht vollkommen konstant.

Tabelle II. Alkoholfällung basischen Fibrinogens in Pufferreihen. 2 ccm Puffer + 1 ccm Fibrinogen + 0,5 ccm Alkohol.

m/10 Veronal:			522	536	554	581	615	662	716	769	823	871	908	936	960
n/10 HCl:			478	464	446	419	385	338	284	231	177	129	92	64	40
p_H:	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2
Flockungsintensität nach 5 Min.	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	
			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

m/20 B:	8	9	10	8	6	5	4
n/10 HCl:	2	1	n/10 NaOH:	2	4	5	6
p_H:	8,9	9,0	9,2	9,5	9,9	11,0	12,4
Trübungsintensität nach 5 Min.	+	+					
	+	+	+				
	+	+	+	+	+	(+)	—

Auch die sonst so scharf differenzierende Hitzefällung ergab die gleichen undeutlichen Maxima. Immerhin treten drei Optima von verschiedener Stärke in allen Reihen auf. Ein starkes, sehr stabiles Optimum bei p_H 7,3, d. h. bei der H^+-Konzentration des Blutes, ein anderes starkes, aber inkonstantes bei p_H 8,9 und ein drittes geringeres

bei p_H 12,5. Im saueren Bereich erscheint die Flockung am spätesten oder überhaupt nicht.

Diese Ergebnisse machten den Eindruck, als ob man keine einheitliche Proteinlösung vor sich habe, sondern eine Mischung mehrerer Proteine. Das ließ sich mit unserer Beobachtung, daß bei der kataphoretischen Darstellung des Fibrinogens zwei Fraktionen zur Kathode wandern, in Einklang bringen. Die beiden Fraktionen unterschieden sich dadurch, daß die eine das Aussehen der Seitenflüssigkeit nicht veränderte, während die andere, durch einen scharfen Spiegel abgegrenzte, ein milchig weißes Aussehen hatte. In bezug auf die Wanderungsgeschwindigkeit verhielten sie sich etwa wie 1,8 : 1. Es erschien angebracht, von diesem Ausgangspunkte her nach anderen Unterscheidungsmerkmalen zu suchen.

Das gleiche Prinzip, das zur Unterscheidung der übrigen Bluteiweiße dient: die verschiedene Löslichkeit in $MgSO_4$, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, wandten wir auf die beiden basischen, getrennt entnommenen Fraktionen des Fibrinogens an. Die folgende Tabelle zeigt ihr Verhalten gegen die Aussalzung mit einigen Neutralsalzen.

Tabelle III. Unterscheidung von Fibrinogen A und Fibrinogen B durch Neutralsalzfällungen.

9. November 1935. Fibrinogen (Pferd).

Fraktion A, entnommen zwischen 6 und 11 cm über der Ausgangslinie, unsichtbar, Sulfosalicylsäure +.

Fraktion B, entnommen zwischen 1 und 5 cm über der Ausgangslinie, weißer Spiegel.

Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$	10 %ig	12 %ig	14 %ig	15 %ig	17 %ig	20 %ig	28 %ig
Fibrinogen A	—	—	—	—	—	—	++
Fibrinogen B	—	—	— —	—	++	++	++

12. November 1935. Fibrinogen (Mensch), siehe oben.

Neutralsalzsättigung	$(NH_4)_2SO_4$, 16 %ige Sättigung	$MgSO_4$, Sättigung	$MgSO_4$, $^1/_2$ Sättigung	NaCl, $^1/_2$ Sättigung	NaCl, $^1/_3$ Sättigung	Spiritus, 92 %
Fibrinogen A	—	+	—	(+)	—	+++
Fibrinogen B	+	+	+	+	+	+++

Aus Tabelle III geht hervor, daß die beiden Fibrinogenfraktionen sich in bemerkenswerter Weise in bezug auf ihre Aussalzbarkeit unterscheiden. Die Fraktion B fällt leichter aus als die Fraktion A. Die Fraktion A fällt erst bei 28 %iger Sättigung mit Ammonsulfat, während die Fraktion B schon bei 16 %iger Sättigung ausfällt. Bei Halbsättigung mit Magnesiumsulfat, ebenso wie bei Drittelsättigung mit Kochsalz fällt nur die Fraktion B aus.

In gleichartigen Fällbarkeitsbestimmungen wurde festgestellt, daß für Pferde-, Rinder- und Menschenfibrinogen dieselben Unterschiede Gültigkeit haben. Obwohl wir die Kritik an der Unterscheidung der Bluteiweiße durch Salzfällungen für gut begründet halten, glauben wir doch, daß sie für die beiden Fibrinogenfraktionen als leicht erkennbare, äußere Unterscheidungsmerkmale dienen können. Die leichtere Fällbarkeit der Fraktion B ist der Ausdruck dafür, daß sie durch solche Salzkonzentrationen dehydratisiert und entladen wird, die die Fraktion A nicht angreifen. Demnach erscheint die Unterscheidung zweier basischer Fibrinogenfraktionen ebenso sehr berechtigt wie die übrigen Unterscheidungen im System der Bluteiweiße.

Für die Bestimmung der isoelektrischen Reaktion des Fibrinogens machten diese Befunde es notwendig, jede Fraktion für sich zu untersuchen.

B. Der isoelektrische Punkt der Fraktion A.

Tabelle IV. Überführung des Fibrinogens A in Boratpuffern.

15. November 1935. Fibrinogen (Mensch), unsichtbar, entnommen an der Kathode 5 bis 9 cm über der Ausgangslinie, geprüft durch quantitative Fällung mit 28 %igem $(NH_4)_2SO_4$. Mittelflüssigkeit: 1 Puffer : 1 Fibrinogen.

Laufende Nr.	Dauer in Std.	Spannung in Volt	m/20 B : n/10 HCl	p_H	Sulfosalicylsäure					
					Kathode			Anode		
					1	2	3	3	2	1
31	1	180	7,5 : 2,5 NaOH	8,8	−−	+	++	+	−	−
33	2	180	9 : 1	9,4	+++	+++	+++	++	+	−
35	1½	180	4 : 6	12,4	++	+++	+++	++	+	+
		Umladung								
34	1	120	1 : 9 NaOH	12,7	−−	−	(−)	+	+	+
32	1	200		13,06	−	−	−	+++	++	+

Der Indifferenzpunkt der Fraktion A liegt also etwa bei p_H 12,5. Dies ist nur ein ungefährer Wert, da es nicht möglich ist, in diesem hohen p_H-Bereich genügend zuverlässige Puffer zu finden. Wie man sieht, ist der letzte Versuch dieser Reihe sogar in ungepufferter n/10 NaOH vorgenommen worden. Dadurch ist die Genauigkeit des p_H-Wertes von 13,06 einigermaßen zweifelhaft geworden. Denn es ist nicht zu verhindern, daß erhebliche Differenzen zwischen der Wasserstoffzahl der eiweißhaltigen Mittelflüssigkeit und derjenigen der eiweißfreien Seitenflüssigkeit in ungepufferter Lösung im Verlauf des Stromdurchganges auftreten. Außerdem ist die Bestimmung des Potentials in ungepufferter, eiweißhaltiger Lösung mit erheblichen Fehlermöglichkeiten belastet. Aus diesen Gründen haben wir auf Überführungs-

versuche in ungepufferten Lösungen, wenn irgend möglich, verzichtet. Trotzdem kann man wohl p_H 12,5 als die oberste Grenze kathodischer Wanderung des Fibrinogens ansehen, da sich die Boratpuffer als brauchbar erwiesen. Ihre Neigung zur Komplexbildung störte nicht die Übereinstimmung mit den Fällungsversuchen und das deutliche Hervortreten des Umladepunktes.

Fällungsversuche mit dem Fibrinogen A in Pufferlösungen.

Tabelle V. Alkoholfällung der Fraktion A in Veronalpuffern (19. November 1935).

0,5 ccm Fibrinogen A + 2 ccm Puffer + 0,5 ccm Alkohol. Die Wasserstoffzahlen gelten für die geprüften Pufferlösungen, nicht für das Gesamtgemisch. Veronal-HCl-Puffer. Trübungsintensität nach 10 Minuten.

p_H:	6,0	6,46	7,24	7,64	7,85	8,2	8,4	8,68	8,82	9,01	9,28	9,6
Trübungsintensität nach 10 Min.	+	+	+ + +	(+) +	+	(+)	(+)	(−)	(−)	−	−	−

Tabelle VI. Alkoholfällung der Fraktion A in Boratpuffern (21. November 1935).

0,5 ccm Fibrinogen A + 1 ccm Puffer + 0,5 ccm Alkohol.

p_H:	6,6	7,1	7,4	7,8	8,2	8,7	9,0	9,6	10,1	11,1	12,4
Trübungsintensität nach 10 Min.	+	+	(+) + +	+	+	(+)	(+)	+	+ +	+	+

Wir finden also ein deutliches Stabilitätsminimum bei p_H 7,3, ein anderes weniger deutliches oberhalb von p_H 10,1. Die Beurteilung der Trübungsunterschiede der Alkoholfällung ist derjenigen der Hitzefällung unterlegen. Diese ist deshalb bei dem Auftreten mehrerer Optima angebracht.

Tabelle VII. Hitzefällung der Fibrinogenfraktion A in Boratpuffern (11. Dezember 1935).

0,5 ccm Fibrinogen A + 1 ccm Boratpuffer erhitzt im Wasserbad.

p_H:	6,6	7,1	7,4	7,8	8,2	8,7	9,0	9,6	10,1	11,1	12,4
Trübung bei 57°	−	−	+	−	− −	−	−	−	−	(−)	−
Trübung bei 65°	−	(−)	+	(-)	− −	−	−	−	+	(+)	(−)
Trübung bei 70°	+	+	+	+	++	−	−	+	+ +	+ +	+

Die Hitzefällung präzisiert also die Optima. Übereinstimmend liegt das stärkste Optimum etwa bei p_H 7,4, der Wasserstoffzahl des Blutes. Daneben aber tritt ein anderes Optimum zwischen p_H 10 und p_H 12,4 deutlich hervor.

C. Der isoelektrische Punkt der Fraktion B.

Tabelle VIII. Überführung des Fibrinogens B in Veronal-HCl-Puffern.

16. November 1935. Fibrinogen (Mensch), weißer Spiegel, entnommen an der Kathode, 1 bis 4 cm über der Ausgangslinie. Mittelflüssigkeit: 1 Puffer : 1 Fibrinogen.

Laufende Nr.	Dauer in Std.	Spannung in Volt	m/10 Veronal n/10 HCl	p_H	Sulfosalicylsäure					
					Kathode			Anode		
					1	2	3	3	2	1
37	1½	170	716 : 284	8,0	++	+++	++	—	—	—
43	1	160	769 : 231	8,2	++	++	++		—	—
42	1½	170	823 : 177	8,4	—	+	++	+	(−)	—
		Umladung								
41	1½	170	871 : 129	8,6	—	++	++	++	++	+
40	1½	170	908 : 92	8,8	—	(+)	++	+++	+++	+
39	2	150	936 : 64	9,0	—	—	(−)	+++	+++	++
38	3	170	985 : 15	9,6	—	—	—	+++	++	++

Die Versuchsreihe zeigt, daß die Umladung des Fibrinogens B ungefähr bei p_H 8,5 erfolgt.

Fällungsversuche mit Fibrinogen B in Pufferlösungen.

Tabelle IX. Hitzefällung des Fibrinogens B (Pferd), 1 bis 4 cm über 0 (29. November 1935). m/10 Veronal — n/10 HCl-Puffer, 0,2 ccm Fibrinogen 1 + 1 ccm Puffer.

p_H:	6,36	6,66	6,81	7,1	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,7	8,8	9,0	9,3	9,6
Trübung bei 38°	—	(+)	(+)	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Trübung bei 56°	(−)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	—	—	—	—	—	—
					+	+										
					+	+										

Tabelle X. Hitzefällung des Fibrinogens B (Mensch) (11. Dezember 1935). Puffer: m/20 Borat : n/10 HCl und n/10 NaOH. 0,5 ccm Fibrinogen B + 1 ccm Puffer.

p_H:	6,6	7,1	7,4	7,8	8,2	8,7	9,0	9,6	10,1	11,1	12,4
Trübung bei 40°	—	—	(+)	+	—	—	—	—	—	—	—
Trübung bei 70°	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)					
	+	+	+	++	+	+	(+)				
	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

Es besteht also insofern ein Unterschied gegenüber der Fraktion A, als das zweite Instabilitätsmaximum oberhalb von p_H 10 hier in keiner Weise vorhanden ist. Das Stabilitätsminimum der Fraktion B liegt sicherlich ebenfalls bei der Wasserstoffzahl des Blutes; der hier etwas nach dem Alkalischen verschobene Wert bei p_H 7,8 konnte in mehreren gleichartigen Versuchen nicht wieder gefunden werden. Er beruhte vielleicht auf pathologischen Blutveränderungen. Im übrigen stimmten alle Fällungsreihen des Fibrinogens B in dem Fehlen eines zweiten Optimums überein, gleichgültig ob es aus Rinder-, Pferde- oder Menschenplasma stammte. Gleichzeitig zeigt ein Vergleich der Fällungsreihen beider Fraktionen, daß das Fibrinogen B schon bei 40° C im Optimum ausfällt, oft sogar schon bei 37° C, während das Fibrinogen A nicht vor 55° C ausfällt.

Tabelle XI. Vergleich der Koagulationstemperaturen der kataphoretisch entmischten Blutproteine.
Kochsalzgehalt: 0,85 %.

Albumin °C	Globulin °C	Fibrinogen A °C	Fibrinogen B °C
85	70	55	37

Die Erwartung, daß den Unterschieden der beiden Fibrinogenfraktionen in bezug auf Lichtbrechung, kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit und Löslichkeit auch andere Verschiedenheiten entsprechen würden, hat sich also in bezug auf die isoelektrische Reaktion und die Koagulationstemperatur bestätigt. Weiterhin fällt jedoch die ganz beträchtliche Diskrepanz zwischen kataphoretischem Umladepunkt und Stabilitätsminimum auf.

Tabelle XII.

	Umladepunkt	Stabilitätsminimum
Fraktion A	12,4	7,3 12,4
„ B	8,5	7,3

Wenn wir auch nicht erwarteten, daß das Verhalten des Fibrinogens der Theorie des idealen Ampholyten entsprechen würde, so ist diese Differenz doch größer als man es sonst an Globulinen sieht. Vermutlich beruht sie auf einer speziellen Eigenschaft des Fibrinogens, die mit seiner physiologischen Funktion zusammenhängt und die den Gegenstand weiterer Untersuchungen bildet.

D. Das saure Fibrinogen.

Die beiden zur Kathode wandernden Fraktionen bilden nicht die Gesamtheit des Fibrinogens. Gleichzeitig wandert bei der Wasserstoffzahl des Blutes Fibrinogen zur Anode. Schon *Theorell* (7) hat dies festgestellt. Nach seinen Angaben ist das Verhältnis seiner Wanderungsgeschwindigkeit zu der von Globulin und Albumin 1 : 1, 8 : 5. Wir selbst fanden ein Verhältnis von 1 : 1,5 : 5 [*Kylin* und *Paulsen* (1)]. Das saure, kathodenwärts wandernde Fibrinogen läßt sich nun aber nicht durch die Kataphorese isolieren; dadurch stößt eine vergleichende Untersuchung mit dem basischen Fibrinogen auf Schwierigkeiten. Während man von Fällungsversuchen mit dem anodenwärts wandernden Plasma kein dem sauren Fibrinogen entsprechendes Optimum erwarten kann, ist es doch möglich, seinen elektrophoretischen Umladepunkt zu bestimmen. Wir entnahmen das anodenwärts gewanderte Plasmagemisch, nachdem wir die fibrinogenfreien Schichten abpipettiert hatten. Dieses Gemisch ließen wir in Phosphatpuffern kataphoretisch wandern und bestimmten die Wanderungsrichtung des sauren Fibrinogens, indem wir die Seitenflüssigkeit in drei Portionen mit 28 %igem $(NH_4)_2SO_4$ sättigten.

Tabelle XIII. Überführungsversuche mit saurem Fibrinogen. (3. Dezember 1935.) Anodisches Plasma (Mensch). Mittelflüssigkeit: 1 Plasma: 1 Puffer.

Laufende Nr.	Dauer in Std.	Spannung in Volt	sek. Phosph. : pr. Phosph.	p_H	$(NH)_2SO_4$-Trübung					
					Kathode			Anode		
					1	2	3	3	2	1
54	$1^1/_2$	200	5 : 5	6,8	—	—	+	+++	+	(+)
52	$1^1/_2$	180	3 : 7	6,46	—	+	+	+++	+	—
53	5	160	1 : 9	5,9	—	+	+	++	+	—
55	$1^1/_2$	180	0,25 : 9,75	5,3	+	++	+++	+	+	—
57	2	170	0,1 : 9,9	4,97	—	+++	+++	+	+	—
56	2	170	10,0	4,53	—	+++	++	—	—	—

Bei p_H 4,53 wandert kein Fibrinogen mehr zur Anode. Das arithmetische Mittel der Zone nicht eindeutiger Konvektion liegt bei p_H 5,4, einem Wert, der mit den zuverlässigsten bisherigen Werten von ungefälltem Fibrinogen gut übereinstimmt.

E. Exsudatfibrinogen.

Außer im Plasma ist in vielen Exsudaten reichlich Fibrinogen vorhanden. Wir haben Pleuraexsudat und Ascites kataphoretisch entmischt und in beiden Fällen kathodenwärts wanderndes Fibrinogen gefunden. Dieses Fibrinogen zeigte die Eigenschaften der Fraktion B in bezug auf Fällbarkeit, Wanderungsgeschwindigkeit, Koagulationstemperatur und auch betreffs Umladepunkt und Stabilitätsminimum. Sehr charakteristisch ist, daß die Fraktion A in beiden Fällen vollkommen fehlte.

Zusammenfassung.

1. Bei der physiologischen $H^{\cdot}$-Konzentration des Plasmas wandert Fibrinogen zur Anode und zur Kathode.

2. Es gibt außer der sauren zwei basische Fraktionen des Fibrinogens.

3. Fraktion A: farblos, Koagulationstemperatur 55° C, fällt bei 28%iger Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$, Sättigung mit $MgSO_4$, $^1/_2$ Sättigung mit NaCl. Wandert schneller im elektrischen Felde als Fraktion B.

4. Fraktion B: weißer Spiegel, fällt bei 16%iger Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$, $^1/_2$ Sättigung $MgSO_4$, $^1/_3$ Sättigung NaCl. Koagulationstemperatur 37° C. Wandert langsamer als Fraktion A im elektrischen Felde.

5. Beide Fibrinogenfraktionen haben ein Stabilitätsminimum bei p_H 7,3, Fraktion A außerdem ein zweites bei $p_H < 12{,}4$.

6. Der Umladepunkt des Fibrinogens A liegt bei p_H 12,4, des Fibrinogens B bei p_H 8,5, des sauren Fibrinogens bei p_H 5,4.

7. Die Theorie des idealen Ampholyten gilt für das Fibrinogen nicht.

8. Exsudatfibrinogen entspricht der Fraktion B.

Literatur.

1) *E. Kylin* u. *Paulsen*, Act. Med. Scand. **87**, 441, 1936. — 2) *F. Mainzer*, diese Zeitschr. **246**, 164, 182, 1932. — 3) *K. Klinke*, Med. Kolloidlehre **6**, 1933. — 4) *Farkas* u. *Groak*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **66**, 596, 1929. — 5) *P. Rossier*, Arch. Phys. biol. **6**, 129, 1928. — 6) *J. H. Kugelmass*, Arch. internat. Physiol. **21**, 139, 1923. — 7) *H. Theorell*, diese Zeitschr. **223**, 1, 1930. — 8) *E. Kylin*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **175**, 711, 1934. — 9) *H. Bennhold*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilkde. **42**, 273, 1932. — 10) *A. Grönwall*, diese Zeitschrift **282**, 85, 257, 1935. — 11) The *Svedberg* u. *B. Sjögren*, J. Amer. chem. Soc. **52**, 3650, 1930. — 12) *E. Kylin*, Act. med. scand. **87**, 536, 1936. — 13) *A. Grönwall*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **175**. — 14) *P. v. Mutzenbecher*, diese Zeitschr. **266**, 226, 1933. — 15) *G. V. Schulz* u. *G. Ettisch*, Zeitschr. f. phys. Chem. (A) **164**, 97, 1933. — 16) *Johndon* u. *Wormall*, Biochem. J. **26**, 1202, 1932. — 17) *R. Luchsinger*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **59**, 393, 1928. — 18) *F. Vlès*, *Coulon* u. *Nicot*, Arch. Phys. biol. **7**, 55, 1929. — 19) *Nordbö*, diese Zeitschr. **190**, 150, 1927. — 20) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1922. — 21) *W. Pauli* u. *E. Valko*, Handb. d. Kolloidwissenschaft **6**, 1933.

Über Ornitho-Kallikrein.

I. Mitteilung über kreislaufaktive Substanzen der Vögel.

Von

E. Werle und **J. Hürter.**

(Aus dem Laboratorium der Chirurgischen Klinik der Med. Akademie Düsseldorf.)

(Eingegangen am 3. März 1936.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Ausgehend von der bemerkenswerten Tatsache, daß das blutdrucksteigernde Hormon des Hypophysenhinterlappens, das Vasopressin, beim Vogel i. v. injiziert den Blutdruck nahezu unbeeinflußt läßt, während das beim Säugetier blutdruckunwirksame Oxytocin, das den Uterus erregende Hormon des Hypophysenhinterlappens, beim Vogel blutdrucksenkend wirkt, untersuchten wir die Wirkung des körpereigenen Kreislaufhormons Kallikrein beim Huhn (1). Es fand sich, daß das Kallikrein, selbst in gewaltigen Dosen intravenös gegeben, den Blutdruck des Huhns nicht beeinflußt[1]. Erst bei 40 bis 80 Einheiten eines aus Menschenharn stammenden Präparates von mittlerem Reinheitsgrad (100 bis 300 γ) erfolgte manchmal eine geringe Blutdrucksenkung, die wohl zum größten Teil auf Spuren einer von Kallikrein verschiedenen kreislaufaktiven Substanz[2] zurückzuführen ist. Auch Kallikreinpräparate, die nicht aus dem Harn stammen, beeinflussen den Blutdruck des Huhns nicht. So waren 100 Kallikreineinheiten (KE.) eines hochgereinigten Präparates aus Schweinepankreas am Huhn völlig unwirksam[3]. Schon $^1/_{5000}$ dieser Menge vermag am Hund, berechnet auf 1 kg Tier, den Blutdruck merklich zu senken.

Untersuchungen über das Vorkommen des Kallikreins haben ergeben, daß dieser Stoff im Harn, im Blut und Pankreas sämtlicher

[1] Wie inzwischen von uns festgestellt wurde, ist das Kallikrein auch an der Ente unwirksam. Die diesbezüglichen Versuche werden in anderem Zusammenhang mitgeteilt. — [2] Diese Substanz, welche zum Unterschied von Kallikrein kochbeständig ist, macht sich bemerkbar bei i. v. Injektion großer Kallikreinmengen an der Ente, wo sie eine Blutdrucksteigerung verursacht. Da von den bisher bekannten kreislaufaktiven Stoffen nur das Histamin die pharmakologische Eigenschaft besitzt, den Blutdruck beim Huhn zu senken und bei der Ente zu steigern, ist es berechtigt, zu vermuten, daß es sich um Histamin handelt. Es würden nach unseren Messungen manche Kallikreinpräparate pro 1 KE. (= 100 bis 300 γ organische Substanz) 0,02 γ Histamin enthalten. — [3] Das Darstellungsverfahren für dieses Präparat wird demnächst veröffentlicht.

Säugetiere enthalten ist. Kallikrein wurde ferner aufgefunden im Pankreas- und Duodenalsaft, sowie im Kot von Menschen und von Hunden (2). Bei Vögeln war der Stoff im Kot, der ja auch den Harn enthält, nicht nachweisbar (3). Der Befund, daß das Kallikrein des Säugetieres beim Vogel unwirksam ist, ließ nun die Vermutung auftauchen, daß der Vogelorganismus einen dem Kallikrein entsprechenden Körper bildet, der zwar den Blutkreislauf der Vögel, nicht aber den der Säugetiere zu beeinflussen vermag. Diese Vermutung hat sich, wie schon an anderem Ort kurz mitgeteilt wurde, bestätigt (1).

Extrakte aus frischem Hühner-, Gänse- und Taubenkot bewirken bei Hühnern i. v. injiziert starken Blutdruckabfall. Bei Injektionen kleinerer Mengen kehrt der Blutdruck nach etwa 2 Minuten auf seine Ausgangshöhe zurück. Stark wirksame Extraktmengen verursachen langanhaltende Blutdrucksenkung (z. B. 20 Minuten), starke Beschleunigung der Atmung (z. B. um 62 %) und des Herzschlages (z. B. um 57 %). Verwendet man an Stelle des *Ludwig*schen Quecksilbermanometers zur Schreibung der Blutdruckkurve das *Frank-Petter*sche Federmanometer, so bemerkt man außer der Senkung des Blutdruckes Vergrößerung der Pulsamplitude (z. B. um 40 %, Abb. 1). Mitunter erfolgt im Beginn der starken Kreislaufwirkung heftige Entleerung dünnflüssigen Darminhaltes.

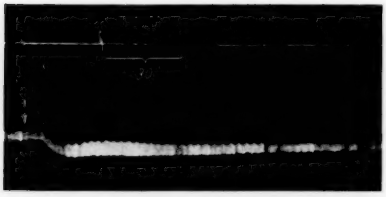


Abb. 1. Huhn, 1,8 kg. Urethan-Äthernarkose; Blutdruck 80 mm. Bei Pfeil intravenöse Injektion von 0,1 ccm Präparat „G".

Bei der Dialyse in Cellophan gegen fließendes Wasser (z. B. 48 bis 72 Stunden lang) nimmt die am Huhn gemessene Kreislaufwirkung der Hühnerkotextrakte nicht wesentlich ab. Die hochmolekulare Wirksubstanz wird von der Membran zurückgehalten. Dagegen passiert ein zweiter im Hühnerkot vorhandener blutdrucksenkender Stoff die Membran. Diese niedermolekulare Substanz, deren Natur wir noch nicht näher untersucht haben, ist am Huhn und am Hund sehr viel schwächer wirksam als an der Katze. Sie wird durch Kochen nicht zerstört. Alle diese Eigenschaften teilt die Substanz mit dem Histamin, mit dem sie möglicherweise identisch und dessen Anwesenheit im Kot nicht unwahrscheinlich ist [vgl. dazu (4)].

Die Kreislaufsubstanz der dialysierten Kotextrakte ist fällbar durch Aceton und durch Alkohol. Sie wird durch Tierkohle leicht adsorbiert. Werden die rohen Kotextrakte über freier Flamme kurz gekocht, so verschwindet die am Huhn gemessene Kreislaufwirkung fast vollständig. So verlor ein wässeriger Hühnerkotextrakt bei p_H 6,5, 5 Minuten lang

über freier Flamme gekocht, 94% seiner Wirkung. Schon bei einstündigem Erhitzen auf 56° werden 60% der aktiven Substanz zerstört. Kocht man dialysierte Kotextrakte ebenso lange, so bleiben beispielsweise nur weniger als 4% der ursprünglichen Wirkung erhalten. Daraus ergibt sich, daß die aktive Substanz des Hühnerkotes äußerst hitzeempfindlich ist. Versetzt man die wirksamen Extrakte mit n Natronlauge oder n Salzsäure, so geht ihre Kreislaufwirkung gleichfalls verloren. Die Substanz ist gegen n Natronlauge empfindlicher als gegen n Salzsäure. So verlor die gleiche Lösung mit n Natronlauge versetzt in 5 Minuten bei 37° 83%, mit n Salzsäure 25% ihrer Kreislaufwirkung.

Die wirksame Substanz der Hühnerkotextrakte ist empfindlich gegenüber Oxydationsmitteln: Sie wird durch Wasserstoffsuperoxyd und Jod ihrer Wirkung beraubt. Auch nach Einwirkung von Schwefelwasserstoff ist die Substanz unwirksam. Bestrahlt man die Lösungen mit ultraviolettem Licht, so geht ihre Kreislaufwirkung gleichfalls verloren.

Das geschilderte chemische Verhalten des hochmolekularen Kreislaufstoffes der Hühnerkotextrakte gleicht in jeder Einzelheit demjenigen des Kallikreins der Säugetiere. Es wurde deshalb auch das Verhalten der Substanz gegenüber den Inaktivatoren des Kallikreins (2) geprüft. Dabei ergab sich, daß sie inaktiviert wird durch Serum von Hühnern oder Gänsen, aber auch durch Serum von Menschen, Pferden und Schweinen. Auch der aus Rinderdrüsen zu gewinnende Inaktivator des Kallikreins, der von dem des Serums verschieden ist, vermag die Substanz zu inaktivieren.

Die physiologische Verwandtschaft des hochmolekularen Kreislaufstoffes der Vögel und des Kallikreins geht auch aus seiner Verteilung im Organismus hervor. Das Kallikrein entstammt der Bauchspeicheldrüse, in der es in viel höherer Konzentration vorkommt als im Harn. In Muskeln und anderen Organen ist es überhaupt nicht oder nur in ganz geringen Mengen enthalten. Es hat sich nun gezeigt, daß auch wässerige oder essigsaure Extrakte aus frischen oder mit Aceton und Äther getrockneten Bauchspeicheldrüsen von Hühnern eine hochmolekulare Kreislaufsubstanz enthalten, die nach ihren pharmakologischen und chemischen Eigenschaften identisch ist mit derjenigen des Hühnerkotes. Schon die aus 1 mg frischem Hühnerpankreas extrahierte Menge der aktiven Substanz vermag den Blutdruck des Huhnes deutlich herabzusetzen. Auch diese Substanz ist nur am Huhn und nicht am Hund wirksam; so war das 5000fache der beim Huhn eben blutdrucksenkenden Menge eines Präparates beim Hund noch ohne Wirkung. Die Substanz ist thermolabil, empfindlich gegen Säure und Lauge (wobei sich die größere Empfindlichkeit gegenüber Lauge wiederfindet), gegen Oxydationsmittel (H_2O_2, Jod), gegen H_2S und wird durch ultraviolettes Licht

zerstört. Auch im Inaktivierungsverhalten ist sie von der Substanz des Hühnerkotes nicht verschieden. Hühner- und Gänse-, sowie Menschen-, Pferde- und Schweineserum vermögen große Mengen der Substanz zu inaktivieren. Auch der Inaktivator aus Rinderdrüsen vermag das wirksame Prinzip der Pankreasextrakte reversibel zu inaktivieren. Orientierende Versuche über das Vorkommen der Substanz in anderen Organen zeigten, daß sie z. B. in der Muskulatur und in der Leber nicht enthalten ist. Die im Hühnerpankreas und -Kot aufgefundene Substanz läßt sich auch im Gänsekot und -pankreas, ferner im Kot von Tauben nachweisen. Tauben- und Hühnerkot enthalten sehr viel mehr von der Wirksubstanz als der Gänsekot, doch ist die Konzentration im Pankreas der Gänse nicht wesentlich geringer als in dem der Hühner. Der aus Kot und Pankreas des Huhnes erhaltene Stoff wirkt auch an der Ente blutdrucksenkend. Da wir nach diesen Feststellungen nicht daran zweifeln, daß die im Pankreas und Kot von Vögeln nachgewiesene Substanz im Organismus der Vögel dieselbe Rolle spielt wie das Kallikrein in dem der Säugetiere, so schlagen wir vor, den Stoff als Ornitho-Kallikrein zu bezeichnen. Der Name Kallikrein soll für die Substanz des Menschen und der Säugetiere vorbehalten bleiben.

Es drängt sich die Frage auf, welche Unterschiede im Aufbau des Ornitho- und des Säugetierkallikreins die spezifische Wirksamkeit bedingen. Ihre Beantwortung ist vorerst unmöglich. Es können nur Vermutungen angestellt werden, die uns dem Verständnis der vorliegenden Verhältnisse näher bringen sollen. Das bisherige Wissen von der Substanz Kallikrein hat in uns die Arbeitshypothese entstehen lassen, daß für die pharmakologischen Eigenschaften eine allen Kallikreinen, auch dem Ornitho-Kallikrein, gemeinsame aktive Gruppe verantwortlich ist, welche an ein hochmolekulares Trägermolekül befestigt oder in dieses eingebaut ist. Das Trägermolekül hat von Art zu Art einen verschiedenen Bau, so daß für die Substanz am Erfolgsorgan, also an der Zelle der Blutgefäßbahn einer anderen Tierklasse, keine spezifische Haftmöglichkeit besteht, welche wir als Voraussetzung für das Wirksamwerden der aktiven Gruppe ansehen[1]. Interessanterweise scheint sich die Spezifität der Substanz nur auf das Erfolgsorgan der Blutgefäßerweiterung zu beziehen und nicht auf das Inaktivierungssystem, wie die oben mitgeteilten Ergebnisse zeigen. Diese sind zugleich eine wesentliche Stütze für die Ansicht, daß die aktive Gruppe stets denselben Bau aufweist. Zwar gibt es sicher nachgewiesene, geringe chemische Unterschiede im Molekülbau auch innerhalb der Kallikreine der Säugetierreihe, die sich durch das Inaktivierungsverhalten zu erkennen geben. So läßt sich z. B. das Kallikrein des Hundes zwar durch Inaktivator aus Serum, nicht aber durch den Inaktivator aus Rinderdrüsen inaktivieren und unterscheidet sich dadurch vom Kallikrein des Menschen und des Schweines. Wenn auch der Inaktivator jeweils die aktive Gruppe blockiert,

[1] Das kleine Molekül des Hormons Adrenalin wirkt, wie wir uns in eigenen Versuchen überzeugten, an Vögeln ebenso stark blutdrucksteigernd wie bei den Säugetieren.

so ist es doch nicht ohne weiteres zu entscheiden, ob diese chemische Veränderung die aktive Gruppe oder das Trägermolekül betrifft.

Ob der hochmolekulare Träger ein Eiweißmolekül ist oder nicht, läßt sich zur Zeit noch nicht entscheiden. Zwar haben in quantitativ chemischen Untersuchungen *Kraut* und Mitarbeiter (5) bei manchen Präparaten Eiweißreaktionen vermißt, doch sind diese Versuche nicht beweisend, solange man nicht den reinen Stoff Kallikrein in Händen hat.

Experimenteller Teil.

Die Technik der Blutdruckmessung am Huhn ist die a. a. O. (1) beschriebene. Die Atmungsgeschwindigkeit wurde durch Auszählen mit Hilfe der Stopuhr ermittelt, die Pulsfrequenz an der mit dem *Frank-Petter*schen Manometer geschriebenen Blutdruckkurve ausgezählt.

Die blutdrucksenkenden Substanzen des Hühnerkotes.

1. Frischer, nicht verunreinigter Hühnerkot wird mit dem Extraktionsmittel (dest. Wasser oder n/50 Essigsäure) angeteigt. Dann mit insgesamt der doppelten oder dreifachen Flüssigkeitsmenge 10 Stunden unter öfterem Umrühren in der Kälte belassen. Dann wird in der Kälte durch Faltenfilter klar filtriert, wobei eine dunkelbraune Flüssigkeit erhalten wird. Die Filtrationsgeschwindigkeit ist sehr gering, die Filtration sehr unvollständig. Zur Entfernung niedermolekularer Verunreinigungen und anorganischer Salze wird das Filtrat in Cellophanbeuteln 48 Stunden lang gegen stark fließendes Brunnenwasser dialysiert.

Standardpräparat „G". Zur weiteren Reinigung werden die Dialysate mit der vierfachen Menge Aceton gefällt. Der braune Niederschlag wird auf der Zentrifuge isoliert, mit Aceton gewaschen und mit Äther getrocknet. Es wird ein graubraunes Pulver erhalten.

Beispiel. 1000 g Hühnerkot + 3 Liter n/50 Essigsäure. 2 Liter Filtrat. Nach 48stündiger Dialyse 2200 ccm Dialysat. Fällung mit 8800 ccm Aceton. Nach dem Waschen mit Aceton und Äther werden 2,43 g Trockenpulver erhalten. 1 mg davon entspricht etwa 250 mg frischem Hühnerkot. Dieses Trockenpulver wird als Standardpräparat zur vergleichenden Auswertung der übrigen Extrakte verwendet. Es werden davon jeweils 100 mg in 10 ccm Wasser aufgenommen; nach 24stündigem Stehen unter öfterem Umrühren wird von wenig Ungelöstem abzentrifugiert. Die Lösung enthält pro 1 ccm 8,34 mg organische Substanz und 1,1 mg Asche. 0,1 ccm dieser Lösung ergeben am Huhn eine sehr starke, lang anhaltende Senkung, 0,01 ccm senken den Blutdruck eines 2 kg schweren Huhns noch eben.

2. *Verhalten der kreislaufaktiven Substanzen der Hühnerkotextrakte bei der Dialyse und beim Kochen.* Für die Charakterisierung kreislaufaktiver Substanzen und ihre Abgrenzung gegeneinander ist die Verwendung verschiedener Testtiere von Vorteil. Aus dem Vergleich der Wirkung eines und desselben Extraktes bei verschiedenen Tieren lassen sich wertvolle Anhaltspunkte für die Natur und die Anzahl der wirk-

samen Substanzen gewinnen. Als weiteres, wertvolles Unterscheidungsmerkmal für blutdrucksenkende Stoffe hat sich ihr Verhalten beim Kochen und bei der Dialyse bewährt. Es werden deshalb gekochte und unveränderte, dialysierte und nichtdialysierte Extrakte am Huhn und, soweit es notwendig erscheint, auch an der Katze und am Hund ausgewertet.

Beispiel. 50 ccm eines wässerigen Hühnerkotextraktes werden im Cellophanbeutel 30 Stunden lang gegen 50 ccm dest. Wasser dialysiert. Der Inhalt des Beutels wird dann noch weitere 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert.

Auswertung des undialysierten Extraktes. Der undialysierte Extrakt ist am Huhn stark wirksam. 0,03 ccm davon senken den Blutdruck noch um 5 mm. Nach 5 Minuten langem Kochen über freier Flamme wirken 0,5 ccm nur noch ebenso stark wie 0,03 ccm des ungekochten Präparates, d. h. die Aktivität ist auf $^1/_{17}$ zurückgegangen. Es ist also die für den weitaus größten Teil der Kreislaufwirkung am Huhn verantwortliche Substanz des Hühnerkotextraktes thermolabil. Prüft man dagegen die Wirkung des gekochten und nicht gekochten Extraktes an der *Katze*, so ergibt sich für gleiche Extraktmengen die gleiche Wirkung: 0,2 ccm der gekochten Lösung senken den Blutdruck wie 0,2 ccm der unveränderten Lösung [siehe Abb. 7 in (1)] und zwar um 15 mm. Am *Hund* war die Wirksamkeit von 5 ccm des Extraktes nur eben erkennbar.

Auswertung der „stehenden" Dialyse. Am Huhn wirken Außen- und Innenflüssigkeit der stehenden Dialyse blutdrucksenkend. Es ist jedoch die Außenflüssigkeit sehr viel schwächer wirksam als die Innenflüssigkeit. 2 ccm „Außen" ergeben erst die gleiche Blutdrucksenkung wie 0,2 ccm „Innen". Auch an der *Katze* ist sowohl die Außen- als auch die Innenflüssigkeit blutdrucksenkend.

Nach der Dialyse gegen fließendes Wasser sind an der Katze 1,0 ccm der Lösung eben noch wirksam und ergeben die gleiche Blutdrucksenkung wie 0,05 ccm der Außenflüssigkeit der stehenden Dialyse. Es ist also die an der Katze wirksame Substanz durch die Dialyse auf weniger als $^1/_{40}$ zurückgegangen. Der Vergleich der Wirkung der gegen fließendes Wasser dialysierten und der undialysierten Lösung am *Huhn* läßt zwar auch einen Aktivitätsverlust erkennen, er ist jedoch gering und beträgt weniger als $^1/_3$. Nunmehr sind 2,4 ccm des Präparates nach 5 Minuten langem Kochen ohne Einfluß auf den Blutdruck des Huhns. Es ist also, da schon 0,1 ccm des ungekochten dialysierten Präparates am Huhn deutlich wirksam waren, die Kreislaufwirkung nach dem Kochen auf weniger als $^1/_{24}$ ihrer ursprünglichen Größe zurückgegangen. Stellt man das gegen fließendes Wasser dialysierte Präparat nun nochmals im Cellophanbeutel gegen dieselbe Menge destilliertes Wasser, so ist die Außenflüssigkeit nach 24stündigem Stehen am Huhn völlig wirkungslos.

Aus diesen Daten geht hervor: Der Hühnerkotextrakt enthält mindestens zwei verschiedene blutdrucksenkende Substanzen, eine hochmolekulare, welche die Cellophanmembran nicht oder nur wenig passiert, und eine niedermolekulare, die durch Dialyse abgetrennt werden kann. Die Auswertung des unveränderten Extraktes am Hund zeigt, wie frühere Versuche (3), daß der Hühnerkot kein Kallikrein enthält,

und daß die am Huhn so stark wirksame Substanz am Hund so gut wie wirkungslos ist. Sie scheint also für den Vogelorganismus von spezifischer Wirkung zu sein, so wie das Kallikrein des Säugetieres für den Säugetierorganismus. Die an der Katze sehr stark wirksame niedermolekulare thermostabile Substanz ist am Hund und am Huhn nur von sehr geringer Wirkung. An der 3 kg schweren Katze waren 0,04, am 2 kg schweren Huhn 0,5* und am 20 kg schweren Hund 5 ccm des Extraktes eben wirksam. Pro kg Tier spricht also die Katze etwa 17mal besser an als der Hund und das Huhn. In ihrem Verhalten bei der Dialyse und beim Kochen sowie in ihrem Wirkungsverhältnis am Huhn, an der Katze und am Hund hat die Substanz größte Ähnlichkeit mit Histamin. Dieses ist pro kg Tier am Huhn etwas schwächer, an der Katze jedoch 20- bis 30mal stärker wirksam als am Hund. Am Huhn wirken nämlich pro kg Tier 0,3 γ, am Hund 0,1 γ, an der Katze 0,01 γ Histamin eben blutdrucksenkend.

Gewinnung der kreislaufaktiven Substanz aus Pankreas.

a) Frisches Hühnerpankreas.

Beispiel. Die frischen Bauchspeicheldrüsen von 60 Hühnern werden vom Fett freipräpariert und im Fleischwolf gemahlen. Es werden 125 g Drüsenbrei erhalten. Dann wird mit der dreifachen Menge n/50 Essigsäure

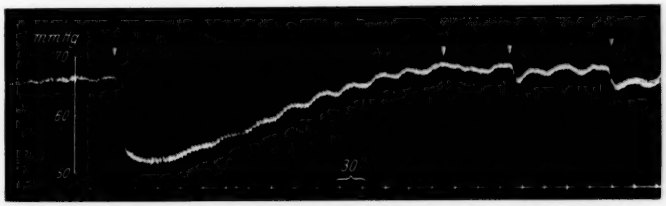


Abb. 2. Huhn, Urethan-Äthernarkose. Bei Pfeil 1 intravenöse Injektion von 0,05 ccm Hühnerpankreasextrakt 48 Stunden dialysiert. Bei Pfeil 2 0,1 ccm desselben Extraktes 5 Minuten gekocht. Bei Pfeil 3 0,005 ccm desselben Extraktes nicht gekocht. Bei Pfeil 4 0,2 ccm desselben Extraktes gekocht.

verrührt und nach fünfstündigem Stehen bei Zimmertemperatur in der Kälte durch Faltenfilter filtriert. Nach 24stündigem Filtrieren wurden 220 ccm klares Filtrat erhalten. Zur weiteren Reinigung wird das Filtrat 48 Stunden gegen stark fließendes Brunnenwasser dialysiert[1]. Nach dem

* Berechnet nach der Wirksamkeit der Außenflüssigkeit der stehenden Dialyse, bei der nach 30 Stunden die niedermolekulare Substanz über die ganze Flüssigkeitsmenge gleichmäßig verteilt ist. — [1] Die niedermolekularen blutdrucksenkenden Stoffe des Pankreasextraktes wurden nicht näher untersucht. Für das Vorhandensein von Adenylsäure z. B. spricht der positive Ausfall der *Bial*schen Pentosereaktion. In dem dialysierten Präparat verläuft die Probe negativ.

Abfiltrieren einer geringen Trübung ist die Lösung farblos und wasserklar. Von dieser Lösung ergeben 0,05 ccm beim Huhn, i. v. injiziert, eine außerordentlich starke, lang anhaltende Blutdrucksenkung (Abb. 2). Wird der Extrakt 3 Minuten lang gekocht, so geht die Wirkung auf $^1/_{26}$ ihres ursprünglichen Wertes zurück. Nunmehr sind 0,2 ccm nur ebenso wirksam wie 0,0075 ccm des unveränderten dialysierten Präparates (siehe Abb. 2). 1 ccm der Lösung enthält 1,49 mg organische Substanz und 0,16 mg Asche. Da noch 0,0075 ccm am 2 kg schweren Huhn wirksam waren, ergibt sich, daß pro kg Huhn noch 5 γ der Substanz eben wirksam sind.

Fällung des wirksamen Prinzips der dialysierten Pankreasextrakte mit Aceton. Vergleich der blutdrucksenkenden Wirkung am Huhn und am Hund. 150 ccm des dialysierten Präparates werden mit der sechsfachen Menge Aceton gefällt. Der rein weiße Niederschlag wird auf der Zentrifuge isoliert, mehrmals mit Aceton und darauf mit Äther gewaschen. Der ätherfeuchte Rückstand wird in 10 ccm Wasser vollständig aufgelöst. Es resultiert eine schwach gelbliche, etwas trübe Lösung. Von dieser Lösung ergeben 0,001 ccm eine gut meßbare Blutdrucksenkung am Huhn, während 2 ccm des Präparates am Hund (22 kg schwer), das ist also die 2000fache der am Huhn eben wirksamen Menge, völlig unwirksam sind. Bei einem 17 kg schweren Hund zeigten zwar 4 ccm des dialysierten Pankreasextraktes eine ganz geringe Blutdrucksenkung (vergleichbar mit derjenigen von 0,15 KE.). Die Wirkung war jedoch nach 5 Minuten langem Kochen des Präparates unvermindert. Es vermag also pro kg Hund selbst die 100fache Menge der am Huhn pro kg Tier wirksamen Menge keine Blutdrucksenkung hervorzurufen. Damit ist bewiesen, daß die im Säugetierpankreas vorkommende Substanz Kallikrein im Vogelpankreas nicht anzutreffen ist, ferner, daß die im Pankreas der Hühner vorkommende Substanz für Vögel in ihrer Wirkung spezifisch ist. In der Auflösung der Acetonfällung betrug die Ausbeute an aktiver Substanz 60 %.

b) Nachweis der aktiven Substanz im Gänsepankreas (Abb. 3). Vergleich der Wirkung am Huhn und am Hund.

Beispiel. 14,3 g frisches Gänsepankreas (von zwei Gänsen) wird fein zerschnitten und mit 43 ccm n/50 Essigsäure extrahiert. Nach 4stündigem Stehen wird durch ein Faltenfilter filtriert. Es werden 31 ccm eines schwach gelblichen, klaren Filtrats erhalten (Filtration sehr unvollständig). Danach wird ein zweites Mal mit 42 ccm n/50 Essigsäure 16 Stunden lang extrahiert. Die Filtration ergibt 38 ccm farbloses, wasserklares Filtrat. Die beiden Extrakte werden getrennt 48 Stunden lang dialysiert. Die Auswertung des dialysierten Extraktes am Huhn ergibt, daß schon 0,005 ccm den Blutdruck herabsetzen. Da 1 ccm des dialysierten Präparates 1,26 mg organische Substanz enthält, sind am 1,5 kg schweren Huhn 6 γ der Substanz wirksam, berechnet pro 1 kg Huhn 4 γ.

Abb. 3. Huhn, Urethan-Ätherнarkose. Bei Pfeil 0,2 ccm Gänsepankreasextrakt 48 Stunden dialysiert.

Schon in diesen noch verhältnismäßig rohen Lösungen kommt die blutdrucksenkende Wirkung der Substanz derjenigen gleicher Gewichtsmengen krist. Muskeladenylsäure nahe. Die Auswertung des Extraktes am Hund (17 kg schwer) ergibt, daß 4 ccm

des am Huhn so außerordentlich stark wirksamen dialysierten ersten Extraktes völlig unwirksam sind, d. i. das 800fache der am Huhn eben wirksamen Menge. Es vermag also auch das 80fache der am Huhn pro kg eben wirksamen Menge der Substanz des Gänsepankreas noch keine Kreislaufwirkung beim Hund hervorzurufen.

Der nicht dialysierte Gänsepankreasextrakt war zwar beim Hund von geringer Wirkung (3 ccm entsprachen etwa 0,18 KE.), doch ist diese auf eine kochbeständige Substanz (Adenylsäure?) zurückzuführen. Der zweite Pankreasextrakt war am Huhn ebenso stark wirksam wie der erste, ferner waren der dialysierte und der nicht dialysierte Extrakt am Huhn gleich stark wirksam, d. h. also, daß das am Huhn wirksame Prinzip des Gänse- wie des Hühnerpankreasextraktes hochmolekular ist. Beim Kochversuch (5 Minuten über freier Flamme) geht die Wirkung des Extraktes auf weniger als $^1/_{20}$ zurück, d. h. auch die aktive Substanz des Gänsepankreas ist thermolabil.

Gewinnung der Substanz aus einem Pankreas-Trockenpräparat.

68 g zerkleinertes frisches Hühnerpankreas werden mit 680 ccm Aceton versetzt. Nach $^1/_2$stündigem Rühren wird auf der Nutsche abgesaugt. Der Rückstand wird in der gleichen Weise nochmals mit Aceton behandelt. Nach dem Entfernen des Acetons wird 15 Minuten lang mit 500 ccm Aceton-Äthergemisch, dann zweimal mit je 300 ccm Äther, wie beschrieben, behandelt. Es werden 15,3 g Trockenpankreas erhalten. Davon werden 12 g mit 120 ccm n/50 Essigsäure 10 Stunden bei niedriger Temperatur extrahiert, dann in der Kälte durch Faltenfilter filtriert. 76 ccm Filtrat. Das Filtrat wird 24 Stunden dialysiert. 0,04 ccm des dialysierten Extraktes sind am Huhn schon deutlich wirksam. Blutdrucksenkung 4 mm. 1 ccm des Dialysats enthält 5,05 mg organische Substanz.

Vergleich der Gehalte an Ornitho-Kallikrein von Hühner-, Tauben- und Gänsekot, Hühner- und Gänsepankreas.

Für den genauen Vergleich der Wirkung verschiedener Extrakte und Präparate, z. B. im Gang der Reinigung, die wir begonnen haben, ist es störend, daß die Ansprechbarkeit von Tier zu Tier wechselt, besonders aber auch, daß die Ansprechbarkeit ein und desselben Tieres für dieselbe Lösung mit der Zeit stark abnimmt, eine Erscheinung, die man auch von der Messung anderer kreislaufaktiver Stoffe her kennt. Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen, gehen wir bei den Auswertungen von einem Standardpräparat aus, das wir für die Dauer unserer Untersuchung stabil befunden haben. Wir wählten dazu das Trockenpulver „G".

Es entsprachen in ihrer Blutdruckwirkung 0,01 ccm dialysierten Extraktes aus Hühner- bzw. Gänsefrischpankreas 0,015 ccm „G" bzw. 0,01 ccm „G". Daraus errechnet sich, daß die Konzentration der Substanz „G" im Hühnerpankreas mindestens zehnmal so hoch ist wie

die im Kot. 0,1 ccm Trockenpankreasextrakt entsprechen 0,2 ccm „G". Auch diese Daten ergeben, auf frisches Pankreas umgerechnet, einen Ornitho-Kallikreingehalt, der den des Kotes um das Zehnfache übertrifft. Der Vergleich der Ornitho-Kallikreingehalte von gleichartig hergestellten und behandelten Extrakten aus Tauben-, Hühner- und Gänsekot ergibt: 0,1 ccm Taubenkotextrakt wirkungsgleich mit etwa 0,2 ccm Hühnerkotextrakt, beide entsprechen etwa 0,04 ccm „G". 2 ccm Gänsekotextrakt waren ohne Kreislaufwirkung. Um die aktive Substanz des Gänsekots anzureichern, werden 100 ccm des Extraktes mit der sechsfachen Menge Aceton gefällt und der Niederschlag in 10 ccm Wasser aufgenommen. 0,3 ccm dieser Auflösung entsprechen in ihrer Wirkung 0,075 ccm „G". Daraus errechnet sich, daß im Gänsekot etwa zwölfmal weniger Ornitho-Kallikrein enthalten ist als im Hühnerkot. Das Gänsepankreas enthielt also rund 100mal soviel aktive Substanz wie der Gänsekot.

Verhalten des Ornitho-Kallikreins gegenüber Schwefelwasserstoff, Wasserstoffsuperoxyd, Jod und ultraviolettem Licht.

I. Ornitho-Kallikrein aus Kot.

Zu den Versuchen wurden Lösungen des Standardpräparates „G" verwendet.

a) H_2O_2: 1 ccm „G" wird aufs Zehnfache verdünnt und mit 1 ccm 25%igem H_2O_2 1 Stunde bei 37° belassen. Das überschüssige H_2O_2 wird dann durch 24stündige Dialyse entfernt. Danach ist 1,0 ccm der Lösung völlig wirkungslos. Da schon 0,1 ccm des unbehandelten Präparates eine meßbare Blutdrucksenkung bewirken, sind durch H_2O_2 mindestens 90% der aktiven Substanz zerstört.

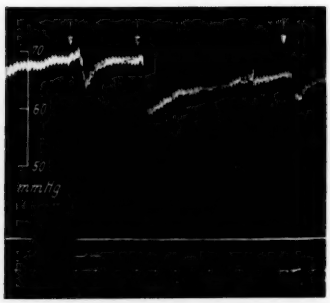


Abb. 4. Huhn, Urethan-Äthernarkose. Bei Pfeil 1 intravenöse Injektion von 0,05 ccm Standardpräparat „G" aus Hühnerkot mit ultraviolettem Licht 6 Stunden bestrahlt. Bei Pfeil 2 Injektion von 0,025 ccm, bei Pfeil 3 0,0125 ccm desselben Extraktes unverändert.

b) Jod: 10 ccm „G" (1 : 10 verdünnt) werden mit 1 ccm n/10 Jod-Jodkalilösung 1 Stunde bei 37° belassen. Zur Entfernung von Jod- und Jodkali wird dann 24 Stunden dialysiert. Danach ist 1 ccm der Lösung unwirksam, d. h. es sind mindestens 90% der aktiven Substanz zerstört.

c) H_2S: In die Lösung „G" (1 : 10 verdünnt) wird einige Stunden lang H_2S eingeleitet. Danach wird der Schwefelwasserstoff durch Luft vertrieben. Nun entspricht 1 ccm der Lösung in ihrer Aktivität 0,08 ccm „G", d. h. es sind 92% der Substanz zerstört.

d) Bestrahlen mit ultraviolettem Licht: Die Lösung „G" wird aufs 20fache verdünnt und in einer flachen Schale mit einer Höhensonne (Vereinigte Quarzlampen-Fabriken Hanau) in einem Abstand von 50 cm 7 Stunden bestrahlt. Danach wirken 0,05 ccm der bestrahlten Lösung wie 0,0175 ccm der unbestrahlten Lösung, es ist also ein Aktivitätsverlust von 63,5% eingetreten (Abb. 4).

II. Ornitho-Kallikrein aus Pankreas.

a) H_2O_2: 1 ccm Hühnerfrischpankreasextrakt wird mit 0,1 ccm H_2O_2 1 Stunde bei 37° belassen. Zur Entfernung des überschüssigen H_2O_2 wird 15 Stunden lang dialysiert. Danach waren 0,85 ccm des Präparates wirkungslos. Da schon 0,025 ccm des unbehandelten Präparates eine starke Blutdrucksenkung verursachten, sind mindestens 98% der Aktivität verschwunden.

b) Jod: 1 ccm Hühnerpankreasextrakt wird mit 0,1 ccm n/10 Jod-Jodkali 1 Stunde bei 37° belassen, dann 15 Stunden dialysiert. Es werden nur noch 3% der ursprünglichen Wirkung wiedergefunden.

c) H_2S: In 5 ccm der Lösung wird 1 Stunde lang H_2S eingeleitet und das Gefäß verschlossen. Nach 20stündigem Stehen wird der überschüssige H_2S durch Luft vertrieben. Da nunmehr 0,8 ccm der mit H_2S behandelten Lösung nur noch wie 0,15 ccm der unveränderten Lösung wirken, sind 98% der Wirksamkeit verschwunden.

Verhalten des Ornitho-Kallikreins aus Pankreas gegenüber Säure und Lauge.

a) HCl: Beispiel: 1 ccm Hühnerpankreasextrakt wird mit 1 ccm n HCl bei 37° 10 Minuten lang belassen. Dann wird mit 1 ccm n Natronlauge neutralisiert. Da 0,8 ccm des behandelten nur noch ebenso stark wirksam sind wie 0,05 ccm des 1 : 3 verdünnten, unbehandelten Präparates, sind 80% der aktiven Substanz zerstört.

b) NaOH: Derselbe Extrakt wird genau wie für Salzsäure beschrieben mit Natronlauge behandelt. 0,9 ccm des mit NaOH behandelten Ansatzes sind völlig wirkungslos. Da die Wirkung von 0,05 ccm des unveränderten 1 : 3 verdünnten Präparates sichtbar war, sind mindestens 85% des mit NaOH behandelten Präparates zerstört.

Verhalten des Ornitho-Kallikreins aus Kot gegenüber Säure und Lauge.

a) HCl: Beispiel: 1,0 ccm der Lösung „G" wird mit 1 ccm n HCl 15 Minuten bei 37° belassen. Danach wird mit 1 ccm n NaOH neutralisiert. Da nunmehr 0,3 ccm des Ansatzes 0,1 ccm des unbehandelten verdünnten Präparates entsprechen, sind 60% der wirksamen Substanz zerstört.

b) NaOH: Das in der gleichen Weise, 5 Minuten lang mit Natronlauge behandelte Präparat verlor mindestens 80% seiner Wirksamkeit, da 0,3 ccm des Ansatzes wirkungslos waren.

Das Inaktivierungsverhalten des Ornitho-Kallikreins aus Kot und Pankreas.

Zur Identifizierung des Kallikreins, wie es im Pankreas und im Harn der verschiedensten Säugetiere und des Menschen aufgefunden wurde, diente besonders das Verhalten der Präparate gegenüber den Inaktivatoren des Kallikreins. Kallikrein aus Harn und aus Pankreas verliert seine Wirkung, wenn man seine Lösungen mit Blutserum vermischt. In Lymphdrüsen und gewissen anderen Organen von Wiederkäuern ist ein weiterer hochaktiver Inaktivator von uns aufgefunden und beschrieben worden (2). Die Inaktivierung des Kallikreins durch Blut und Drüsenextrakt ist reversibel.

Inaktivierung von Ornitho-Kallikrein durch Inaktivator aus Rinderohrspeicheldrüsen.

Für die Inaktivierungsversuche mit Drüseninaktivator ist es störend, daß seine Lösungen am Huhn bei i. v. Injektion Blutdrucksenkungen verursachen. 0,1 ccm eines Inaktivatorpräparates ergaben eine starke, rasch vorübergehende Blutdrucksenkung, die in eine deutliche Steigerung überging. Bei einem mehrere Stunden für die Standardisierung von Kreislaufstoffen verwendeten Huhn, war nach Inaktivatorinjektion nur noch Blutdrucksteigerung zu beobachten. Einen ähnlichen Effekt zeigte an diesem Tier nur noch Histamin. Acetylcholin und Adenylsäure z. B. ergaben reine Blutdrucksenkungen. Es ist möglich, daß in den Extrakten Histamin, vielleicht auch Tyramin (5) oder beides als Verunreinigung enthalten war. Die kreislaufaktive Substanz der Inaktivatorlösung konnte durch Dialyse abgetrennt werden. Sie wurde nicht näher untersucht. Danach enthielt die Inaktivatorlösung pro 1 ccm 1000 Inaktivatoreinheiten (I E.), wobei 1 IE. an 6,7 γ organische Substanz gebunden war.

Neben der Frage, ob der Drüseninaktivator Ornitho-Kallikrein zu inaktivieren vermag, war uns die quantitative Ermittlung des Inaktivierungsvermögens für Ornitho-Kallikrein von besonderer Wichtigkeit. Die Inaktivierungen wurden deshalb in Form von Reihenversuchen vorgenommen, um so die Grenze des Inaktivierungsvermögens feststellen zu können.

Beispiel. Zu 0,2 ccm der Lösung „G" werden je 0,1 ccm Bicarbonat (m/1) und fallende Mengen Inaktivatorlösung zugegeben, nämlich 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 und 0,0125 ccm. Dann werden die Ansätze 1 Stunde bei 37° belassen. In der gleichen Weise wurde eine Versuchsreihe mit Ornitho-Kallikrein aus Hühnerpankreas angesetzt, wobei die konzentrierte Lösung einer Acetonfällung verwendet wurde. Von der Lösung „G" waren an dem zur Standardisierung dienenden Versuchshuhn 0,01 ccm kräftig wirksam. Bei der Auswertung ergab sich, daß sämtliche Ansätze bis auf den niedrigsten, bei welchem die Injektion von 0,3 ccm des Ansatzes noch eine deutliche Aktivität ergab, inaktiviert waren. Da 0,01 ccm „G" bzw.

0,005 ccm Pankreaspräparat am Huhn schon blutdrucksenkend wirkten, vermochte die 15 IE. entsprechende Menge der Inaktivatorlösung die 25- bis 50fache am Huhn eben wirksame Ornitho-Kallikreinmenge zu inaktivieren, 1 IE. also rund das Doppelte bis Vierfache. Ein Vergleich der Inaktivierungsfähigkeiten ein und derselben Inaktivatorlösung gegenüber Ornitho-Kallikrein und Säugetier-Kallikrein kann nicht gegeben werden. Die Inaktivierungsfähigkeiten scheinen aber wenigstens größenordnungsmäßig übereinzustimmen, da 1 IE. etwa das 5- bis 10fache der am Hund eben wirksamen Kallikreinmenge zu inaktivieren vermag.

Es gelingt auch zu zeigen, daß die Inaktivierung durch Drüseninaktivator reversibel ist.

Beispiel. 1 ccm Ornitho-Kallikrein aus Hühnerpankreas + 0,5 ccm dialysierte Inaktivatorlösung + 0,1 ccm m Bicarbonat. Nachdem völlige Inaktivierung eingetreten war (0,3 ccm des Ansatzes waren am Huhn

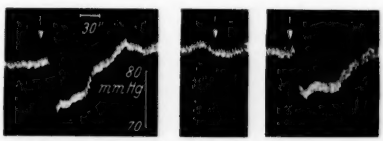


Abb. 5. Huhn, Urethan-Äthernarkose. Bei Pfeil 1 intravenöse Injektion von 0,05 ccm dialysiertem Extrakt aus Hühnerpankreas. Bei Pfeil 2 intravenöse Injektion von 0,2 ccm desselben Extraktes, inaktiviert durch Drüseninaktivator. Bei Pfeil 3 intravenöse Injektion von 0,2 ccm des inaktivierten Extraktes nach Reaktivierung durch Salzsäure.

völlig wirkungslos), werden zu 0,4 ccm des Ansatzes 0,15 ccm n HCl gegeben und nach 2 Minuten langem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur 0,15 ccm n NaOH. Nunmehr war die Injektion der 0,3 ccm des ursprünglichen Ansatzes entsprechenden Menge sehr stark aktiv. Sie entsprach in ihrer Wirkung derjenigen von 0,05 ccm Ornitho-Kallikreinlösung. Die Reaktivierung betrug also 26 % (Abb. 5).

Inaktivierung von Ornitho-Kallikrein durch Inaktivator aus Blutserum (Abb. 6).

Wie die Erfahrungen bei Inaktivierungen durch Serum bei der Katze gezeigt haben, ist es notwendig, zuerst zu prüfen, ob die zu den Inaktivierungsansätzen verwendeten Blutseren bei i. v. Injektion eine

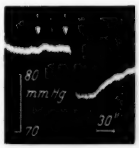


Abb. 6. Huhn, Urethan-Äthernarkose. Bei Pfeil 1 intravenöse Injektion von 0,05 ccm dialysiertem Hühnerpankreasextrakt durch Hühnerserum inaktiviert. Bei Pfeil 2 0,05 ccm des unveränderten Hühnerpankreasextraktes.

Kreislaufwirkung hervorrufen. Die in unveränderten Seren vorhandenen kreislaufaktiven Stoffe machen sich bei i. v. Injektion beim Hund nicht bemerkbar, dagegen bei der Katze, so daß es mitunter schwierig ist, die Inaktivierung von Kallikrein zu beobachten [vgl. dazu (6).]

Bei i. v. Injektion von 0,1 und 0,3 ccm frischem Hühnerserum ist keine Kreislaufwirkung zu beobachten. 0,6 ccm Hühnerserum ergeben eine rasch vorübergehende Senkung von 7 mm. Hühnerserum, das 3 bis 4 Tage in der Kälte gestanden hat, ist mehr als doppelt so stark wirksam als frisches Serum. So erfolgte bei i. v. Injektion von 0,8 ccm Hühnerserum, welches 3 bis 4 Tage bei niedriger Temperatur aufbewahrt war, eine nur wenige Sekunden anhaltende Blutdrucksenkung um 15 mm, während 1 ccm frisches Serum nur eine Senkung von 7 mm ergab. Die wirksame Substanz ist nach dem Kochen nur noch zu 50% vorhanden. Es ist jedoch damit nicht bewiesen, daß die Substanz thermolabil ist, möglicherweise wurde ein erheblicher Teil davon an den beim Kochen entstehenden dicken Eiweißniederschlag adsorbiert. Ähnliche Verhältnisse wie bei Hühnerserum wurden bei Gänseserum angetroffen. Für die Inaktivierungsversuche wurden Hühner- und Gänseserum gegen fließendes Wasser dialysiert. Dabei gelang es beim Gänseserum den weitaus größten Teil, beim Hühnerserum 50% der aktiven Substanz zu entfernen.

Wenn auch die Eigenwirkung der den Inaktivierungsansätzen zugesetzten Seren für die Beobachtung ihrer Inaktivierungswirkung auf das Ornitho-Kallikrein störend ist, so kann man doch unschwer aus dem Verlauf der Blutdrucksenkung und aus ihrer Dauer ablesen, wo die Aktivität der zu inaktivierenden Lösung „G" verschwunden ist. Es ist dann nämlich nur noch die durch das Serum bewirkte, rasch vorübergehende Senkung zu beobachten.

Beispiel der Inaktivierung durch dialysiertes Hühnerserum. Zu je 0,2 ccm dialysiertem Hühnerpankreasextrakt werden 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,06 ccm dialysiertes Hühner- bzw. Gänseserum gegeben. Nach 1 Stunde bei 37° waren in der mit Hühnerserum angesetzten Inaktivierungsreihe (es wurde jeweils die 0,15 ccm Pankreasextrakt entsprechende Menge der Reaktionslösungen injiziert) die drei ersten Ansätze völlig wirkungslos. Im vierten Ansatz war nur noch eine geringe Wirkung zu beobachten. In der mit Gänseserum angesetzten Reihe waren jedoch sämtliche Ansätze wirkungslos. Da von dem angewandten Hühnerpankreasextrakt noch 0,005 ccm am Huhn eine sichtbare Blutdrucksenkung auslösten, vermochten 0,06 ccm Gänseserum das 40fache der beim Huhn eben wirksamen Menge völlig zu inaktivieren. Von dem sehr gut inaktivierenden Menschenserum vermögen 0,06 ccm nur das Doppelte bis Vierfache der am Hund eben wirksamen Menge Kallikrein zu inaktivieren.

Inaktivierung des Ornitho-Kallikreins aus Kot.

Je 0,4 ccm der Lösung „G" werden zu 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 ccm Hühnerserum zugegeben. Nach 4,5 Stunden waren bei 37° die vier ersten Ansätze völlig inaktiv, der letzte Ansatz besaß noch eine deutliche Aktivität.

Inaktivierung des Ornitho-Kallikreins durch Serum von Menschen, Pferden und Schweinen.

In der für Hühner- und Gänseserum beschriebenen Weise werden Ansätze mit dialysiertem Pankreasextrakt und der Lösung „G" durch-

geführt. Es vermochten z. B. 0,5 ccm Menschen- und Schweineserum 0,2 ccm „G" bzw. 0,2 ccm dialysierten Pankreasextrakt zu inaktivieren. Auch angesäuertes Pferdeserum besaß starkes Inaktivierungsvermögen. Es vermag also menschliches und Säugetierserum sowohl Kallikrein vom Säugetier als auch das vom Vogel verhältnismäßig gut zu inaktivieren. Umgekehrt hat Hühner- oder Gänseserum für Kallikrein aus Harn nur ein sehr geringes oder überhaupt kein Inaktivierungsvermögen. Ob es sich in beiden Fällen um denselben Inaktivator handelt, läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden. Um darüber Aufschluß zu erhalten, wurde das zur Inaktivierung verwendete Serum 2 Stunden lang auf 56° erhitzt. Wie aus einer früheren Untersuchung hervorgeht, verliert nach dieser Behandlung das menschliche Serum seine Inaktivierungsfähigkeit für Kallikrein fast vollständig, während andere Seren, wie z. B. Schweineserum, als weniger empfindlich sich erweisen. Es werden zu je 0,4 ccm dialysiertem Extrakt aus Hühnertrockenpankreas 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,06 ccm Menschen- bzw. Hühnerserum gegeben, welches a) 2 Stunden auf 56° erhitzt, b) unbehandelt geblieben war[1]. Bei sämtlichen Ansätzen mit erhitztem und nicht erhitztem Hühnerserum ist keine Kreislaufwirkung mehr festzustellen, d. h. die Inaktivierungsfähigkeit des Hühnerserums hat nur wenig oder überhaupt nicht abgenommen. Bei der Inaktivierungsreihe durch unverändertes menschliches Serum ist noch der Ansatz 0,5 ccm Serum + 0,4 ccm Pankreasextrakt völlig inaktiv. Von der Versuchsreihe mit erhitztem Serum war jedoch der Ansatz 1 ccm Serum + 0,4 ccm Hühnerpankreasextrakt noch zu 38% aktiv. Es ist also durch die Erhitzung die Inaktivierungsfähigkeit des Menschenserums um mehr als die Hälfte zurückgegangen; die Abnahme des Inaktivierungsvermögens gegenüber Säugetier-Kallikrein bei dieser Behandlung ist jedoch weit größer. Es vermochte 1 ccm des unveränderten Serums bei 37° 5 KE. zu inaktivieren, während das auf 56° erhitzte keine Inaktivierungsfähigkeit mehr zeigte. Vom Hühnerserum vermochten 10 ccm sowohl des erhitzten als auch des unerhitzten je nur 1 KE. zu inaktivieren. Diese Versuche scheinen dafür zu sprechen, daß die inaktivierenden Prinzipien untereinander nicht identisch sind.

Untersuchung weiterer Organe auf ihren Gehalt an Ornitho-Kallikrein.

Im Hinblick darauf, daß die hier beschriebene Substanz in ihrem chemischen Verhalten vollkommene Ähnlichkeit mit dem Kallikrein besitzt, haben wir einige orientierende Versuche darüber angestellt, ob sie auch in anderen Organen anzutreffen ist. Es wurden Leber und Muskulatur in der gleichen Weise behandelt, wie die frischen Hühner- und Gänsebauchspeicheldrüsen.

[1] Es sei bemerkt, daß die Inaktivierungsansätze, sowohl der erhitzten als auch der nicht erhitzten Seren, keine Niederschläge aufweisen.

a) *Leber*: 1,5 ccm des dialysierten Leberextraktes ergeben eine geringe Blutdrucksteigerung, die nach dem Kochen des Präparates nicht vermindert ist.

b) Die *Muskulatur* enthielt ebenfalls kein Ornitho-Kallikrein, der Extrakt bewirkte eine geringe Blutdrucksenkung, die aber nach dem Kochen des Präparates unvermindert bestehen blieb.

Die Wirkung des Ornitho-Kallikreins an der Ente.

Wir haben uns davon überzeugt, daß Ornitho-Kallikrein auch an der Ente[1] blutdrucksenkend wirkt. Dabei zeigte sich, was uns allerdings nicht überraschte, daß das Präparat „G" noch durch eine kreislaufaktive Substanz verunreinigt ist, die in ihrer Wirkung dem Histamin

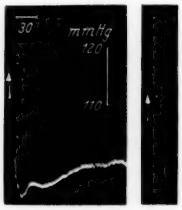


Abb. 7. Ente, 1500 g. Urethan-Äthernarkose. Bei Pfeil 1 intravenöse Injektion von 0,1 ccm Auflösung der Acetonfällung von dialysiertem Gänsepankreasextrakt. Bei Pfeil 2 0,2 ccm desselben Präparates 5 Minuten über freier Flamme gekocht.

nahesteht. Histamin bewirkt an der Ente Blutdrucksteigerung; diese Blutdrucksteigerung ist nicht bei jeder Ente gleichmäßig stark vorhanden. Unter den vier von uns für Blutdruckversuche verwendeten Tieren befand sich ein einziges, welches auf Histamin mit einer reinen Blutdrucksteigerung reagierte und zwar so, daß noch 0,05 γ Histamindichlorhydrat gut gemessen werden konnten. Bei den übrigen Tieren verursachte Histamin eine Blutdrucksenkung, an die sich eine ebenso starke Steigerung anschloß. Bei dem erst erwähnten äußerst empfindlichen Tier verursachten 0,04 ccm „G" eine Blutdrucksenkung, die aber nicht so stark ist wie beim Huhn. Kochte man die Lösung „G" 5 Minuten lang und injizierte nunmehr, so erfolgte eine reine Blutdrucksteigerung, die derjenigen von 0,2 γ Histamin entsprach. Hühner- und Gänsepankreasextrakte ergaben bei einer anderen Versuchsente sehr starke Blutdrucksenkungen. Zur Injektion gelangte z. B. die Lösung der durch Aceton aus dialysiertem Extrakt von frischem Gänsepankreas gefällten aktiven Substanz. [11 ccm des dialysierten Extraktes wurden mit 66 ccm Aceton gefällt und in 5 ccm Wasser aufgelöst.] 0,1 ccm

[1] Die Blutdruckmessung an der Ente wird wegen der ungünstigen anatomischen Verhältnisse nicht am Bein, sondern in der Weise vorgenommen, daß man die Halsschlagader an das Manometer anschließt und die große Halsvene für die Injektionen benutzt.

davon bewirkten eine lang anhaltende Blutdrucksenkung von 24 mm. 0,2 ccm des 3 Minuten lang gekochten Präparates erzeugten nur noch eine rasch vorübergehende Senkung von 3 mm (Abb. 7).

Die Wirkung des Ornitho-Kallikreins an der Katze.

Daß die Kot- und Pankreasextrakte außer Ornitho-Kallikrein noch Spuren anderer kreislaufaktiver Stoffe enthalten, wie sie in jedem beliebigen tierischen Organextrakt oder Sekret enthalten sind, geht auch aus ihrer Wirkung an der Katze hervor, dem für die Messung der meisten kreislaufaktiven Stoffe wohl weitaus empfindlichsten Testtier.

Ornitho-Kallikrein aus Kot: 0,1 ccm der unverdünnten Lösung „G" senkt den Blutdruck der Katze noch eben. Die Wirkung nimmt aber nach 5 Minuten langem Kochen nicht ab.

Ornitho-Kallikrein aus Gänsepankreas: 1 ccm dialysierter Gänsepankreasextrakt senkt den Blutdruck der Katze nur um 5,5 mm. Am Huhn ist schon der 200. Teil davon, nämlich 0,005 ccm, ebenso stark wirksam. Während aber am Huhn nach 5 Minuten langem Kochen die Wirkung des Extraktes auf $^1/_{20}$ des ursprünglichen Wertes zurückgeht, bleibt sie an der Katze fast vollständig erhalten (Verlust 25%).

Ornitho-Kallikrein aus Hühnerpankreas: 0,6 ccm Hühnerpankreasextrakt (1. Extrakt aus Hühnertrockenpankreas dialysiert) senken den Blutdruck der Katze um 7 mm. Nach 5 Minuten langem Kochen geht die Wirkung an der Katze um 50% zurück, doch ist die wirksame Substanz aus den bei Gänsepankreas angegebenen Gründen verschieden von Ornitho-Kallikrein. Die geringe Wirkung des 2. Extraktes nimmt nach dem Kochen nicht ab.

Aus den angegebenen Versuchen geht hervor, daß das Ornitho-Kallikrein auch an der Katze unwirksam ist.

Literatur.

1) *E. Werle*, Klin. Wochenschr. 1936, S. 164. — 2) Siehe die zusammenfassende Darstellung des Kallikreins von *E. Werle* in Oppenheimers Handb. d. Biochem., Erg.-Bd. 3, S. 1104, 1936. — 3) *E. Werle*, diese Zeitschr. **269**, 415, 1934. — 4) *H. Burchard*, Klin. Wochenschr. 1934, S. 1073. — 5) *O. Krayer*, *F. Grabe* u. *K. Seelkopf*, ebenda, S. 1381. — 6) *A. Bauer*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **168**, 111, 1932.

Die Wirkung der ultravioletten Strahlung auf das Villikinin.

Von **G. v. Ludány.**

(Aus dem allgemeinen pathologischen Institut der Kgl. Pázmány Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 24. Februar 1936.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die früheren Untersuchungen über die Physiologie der Darmzottentätigkeit zeigten, daß nicht nur lokale Reize (1) und Nervenwirkungen (2) die Darmzottenbewegung beeinflussen, sondern dieser bei der Verdauung und Resorption eine wichtige Rolle spielende Mechanismus auch auf hormonalem Wege geregelt wird (3). Es wurde gezeigt, daß eine 0,4%ige HCl-Lösung ins Duodenum eingeführt in dessen Schleimhaut einen Stoff aktiviert, der in die Blutbahn gelangend, die Zottenbewegung stark fördert. Ganz ähnliche Resultate wurden nach intravenöser Verabreichung salzsaurer Duodenum- bzw. Dünndarmschleimhautextrakte erhalten. Im weiteren Verlaufe der Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß dieser Stoff ein neues Hormon ist, welches mit dem auch durch denselben Mechanismus zustande kommenden Sekretin und Cholecystokinin nicht identisch ist (4). Seiner Wirkung entsprechend wurde dieses Hormon von uns *Villikinin* genannt. Im weiteren konnte nachgewiesen werden, daß das Villikinin kein histamin-, cholin- bzw. adenosinartiger Stoff ist. Es wird von Pepsin, Trypsin und Erepsin nicht angegriffen. Das Zottenhormon diffundiert leicht durch eine Diffusionshülse (*Schleicher & Schüll*, Nr. 579); es wird durch Tierkohle nicht adsorbiert und durch Trichloressigsäure nicht gefällt. Außer durch Salzsäure wird das Villikinin aus seiner unwirksamen Prosubstanz auch durch andere Säuren aktiviert (5). Bei diesem Prozeß spielt neben der Wasserstoffionenkonzentration auch das Anion eine Rolle. Das Villikinin ist hitzebeständig, in Wasser, neutralen Salzlösungen, verdünnten Säuren und Alkohol bzw. Aceton löslich.

Da es sich herausgestellt hatte, daß gewisse Hormone, wie unter anderem das Insulin und das Sekretin, welches letztere auch durch denselben Mechanismus aktiviert wird wie das zottenwirksame Villikinin, bei Behandlung mit ultravioletten Strahlen ihre physiologische Wirkung einbüßen (6), schien es uns von nicht geringem Interesse, das die Zottenbewegung regulierende Hormon diesbezüglich einer Prüfung zu unterwerfen. Aus der Duodenum- und Dünndarmschleimhaut von Hunden wurden Extrakte bereitet und es wurde deren Gehalt an Villikinin und gleichzeitig auch an Sekretin vor und nach ultravioletter Bestrahlung mittels biologischer Methoden bestimmt.

Die Bereitung der Extrakte geschah folgendermaßen: einem großen, etwa 15 bis 20 kg schweren Hunde wurde das Duodenum und Jejunum

entfernt und die Mucosa desselben abgeschabt. 20 g der so erhaltenen Schleimhaut wurden mit genügend Seesand 5 Minuten lang zerrieben und dieser Brei mit 100 ccm 0,4%iger HCl-Lösung vermischt. Unter fortwährendem schwachen Kochen wurde dann der Extrakt mit 40%iger NaOH versetzt unter Beibehaltung einer gegen Lackmus schwach sauren Reaktion. Dann wurde er filtriert, der so erhaltene Auszug ist klar und goldgelb.

Auf diese Weise hergestellte Extrakte enthalten Villikinin und Sekretin. Ein Teil dieser Auszüge wurde dann mit ultravioletten Strahlen behandelt. Als Strahlenquelle diente eine Quarzlampe (großes Modell

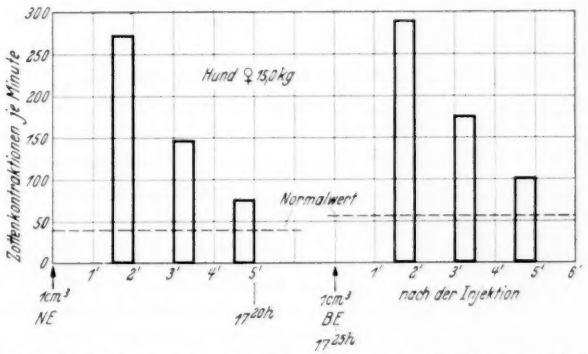


Abb. 1. Die Wirkung der normalen (NE) und mit ultravioletten Strahlen behandelten (4 Stunden) Darmschleimhautextrakte (BE) auf die Darmzottentätigkeit des Hundes.

von *Hanau*). Die Extrakte wurden in einer wassergekühlten offenen Schale bei einer Schichtdicke von 3 mm und einer Lampendistanz von 15 cm bestrahlt, wobei die Temperatur ständig unter 15° C blieb. Der Hormongehalt wurde dann auf biologischem Wege bestimmt, und zwar durch die Beobachtung der Darmzottentätigkeit und der Pankreassekretion.

Als Testtiere dienten gleichfalls Hunde, die 24 bis 36 Stunden hungerten. Die Tiere wurden mittels Chloralose narkotisiert und auf ein elektrisches Heizkissen gelegt, um sie während des Versuchs vor Abkühlung zu schützen. Nach Durchtrennung der Bauchwand in der Linea alba, wurde eine Jejunumschlinge in gewohnter Weise auspräpariert. Das Darmstück wurde herausgezogen, gegenüber dem Ansatz des Mesenteriums aufgeschnitten, durch ein in der Mitte durchlöchertes Brett gezogen und die Schleimhautoberfläche mittels Stecknadeln ausgebreitet. Um den thermischen Faktor konstant zu halten, benutzten wir als Wärmungseinrichtung den von uns konstruierten doppelwandigen Metallkasten (7). Die Zottenbewegung wurde mittels Binokularmikroskop beobachtet. Es wurden in einem bestimmten Gesichtsfelde die während 1 Minute ablaufenden Zottenkontraktionen gezählt. Zur Untersuchung der Pankreassekretion wurde eine Kanüle in den Ductus pancreaticus eingeführt und die Tropfenzahl registriert.

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, wird das Villikinin durch UV-Bestrahlung nicht zerstört. Wie aus der Abb. 1 entnommen werden

kann, ist der Darmschleimhautextrakt vor und nach vierstündiger Bestrahlung gleich wirksam. Nach intravenöser Verabreichung von 1 ccm normaler Extraktmenge stieg die Darmzottentätigkeit binnen 1 bis 2 Minuten steil von 40 auf 270 Kontraktionen pro Minute an. Als die Zottenmotorik zur Norm zurückgekehrt war, wurde dieselbe Extraktmenge, aber aus dem bestrahlten Auszug, injiziert und zeigte den gleichen Erfolg. Dagegen wird der Sekretingehalt des Extraktes durch UV-Bestrahlung schon in kürzerer Zeit zerstört. Wie Abb. 2 zeigt, wird das Sekretin binnen 2 Stunden vollkommen inaktiviert, so daß nach dreistündiger UV-Bestrahlung die gleiche Tropfenzahl festgestellt werden kann, wie bei dem 2 Stunden lang behandelten Extrakt. Diese Untersuchungen konnten in weiteren drei Fällen mit demselben Resultat wiederholt werden.

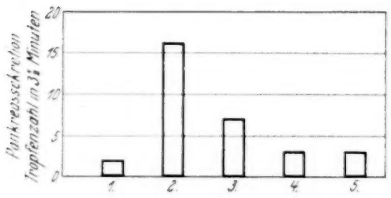


Abb. 2. Die Wirkung der normalen und mit ultravioletten Strahlen behandelten Darmschleimhautextrakte auf die Pankreassekretion.
1 = Normalsekretion,
2 = 1 ccm Normalextrakt,
3 = 1 „ 1 Std. bestrahlter Extrakt,
4 = 1 „ 2 „ „ „
5 = 1 „ 3 „ „ „

Die Versuche zeigen, daß, obzwar das Villikinin und das Sekretin durch denselben Mechanismus aktiviert werden, diese beiden Hormonstoffe bezüglich ihrer Eigenschaften doch von verschiedener Natur sind. Dieser Umstand wird neben den älteren Befunden auch durch das verschiedene Verhalten der beiden Hormonstoffe gegen das ultraviolette Licht gekennzeichnet, was mit den früheren Untersuchungen in vollkommenem Einklang steht.

Zusammenfassung.

1. In Darmschleimhautextrakten wird das Villikinin durch UV-Strahlen nicht zerstört.

2. Die Angabe, daß ultraviolette Licht das Sekretin inaktiviert, wird bestätigt.

3. Damit ist neben früheren Befunden noch ein weiterer Beweis erbracht, daß das Villikinin nicht mit dem Sekretin identisch ist.

Literatur.

1) *v. Kokas* u. *v. Ludány*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **169**, 140, 1933; *de Ludany*, C. r. Soc. Biol. **221**, 293, 1936. — 2) *Ludány* u. *Jourdan*, ebenda **119**, 1189, 1935. — 3) *v. Kokas* u. *v. Ludány*, Pflügers Arch. **232**, 293, 1933; usw. — 4) *Dieselben*, ebenda **234**, 182, 589, 1934; usw. — 5) *Dieselben*, ebenda **236**, 166, 1936. — 6) *Ågren*, Skand. Arch. f. Physiol. **69**, 1, 1934. — 7) *v. Kokas* u. *v. Ludány*, Pflügers Arch. **231**, 20, 1932.

Die analytische Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futtermitteln.

Von

G. Pfeiffer.

unter Mitarbeit von **L. Clarenz.**

(Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität Bonn.)

(Eingegangen am 4. März 1936.)

Die im Jahre 1880 von *Stutzer* (1) eingeführte Methode der analytischen Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futterstoffen, die noch heute mit geringen Abänderungen allgemeine Anwendung findet, besteht in der Behandlung der Substanz unter bestimmten Bedingungen mit aktiven Verdauungsenzymen.

Stutzer stellte das Enzympräparat durch Extraktion von Magenschleimhaut mit verdünnter Salzsäure her. *Kühn* (2) verdoppelte später die Menge der anzuwendenden Verdauungsflüssigkeit. *Wedemeyer* (3) verwendete käufliches Pepsin in salzsaurer Lösung. Die allgemein gebräuchliche Form der Methode *Stutzer* ist daher heute die, daß man 2 g gemahlene und gesiebte Substanz unter Zusatz von 1 g Pepsin und 2×10 ccm 25%iger Salzsäure mit 480 ccm Wasser 48 Stunden bei Bruttemperatur und unter öfterem Umrühren der Verdauung überläßt. Der auf diese Weise ermittelte verdauliche Rohproteinanteil in Futtermitteln zeigt nach mehrfachen Mitteilungen bei Kontrollen erhebliche Schwankungen. Infolgedessen änderte *Wewers* (4) die Methode kürzlich dahin, daß er bei Blut- und Fischmehlen nur 1 g Substanz, statt bisher 2 g, anzuwenden empfahl und fettreiche Fischmehle vor der Verdauung mit Äther extrahierte. *Wagner* (5) wies zum Ausgleich der Differenzen auf die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration im Verdauungsgemisch hin und gab als günstigste Bedingung für Fischmehle einen anfänglichen p_H-Wert von 1,1 an.

Die angegebenen Modifikationen an der *Stutzer*schen Methode ergeben nach unseren Feststellungen jedoch immer noch keine Übereinstimmung in den maximalen Verdauungsgrenzwerten, besonders dann nicht, wenn die Untersuchungen auf die verschiedensten Substanzen ausgedehnt und von getrennt arbeitenden Stellen durchgeführt werden. Geringfügige Temperaturschwankungen, sowie die Häufigkeit des Umrührens der Substanz in der Verdauungsflüssigkeit beeinflussen sichtbar die Höhe des Verdauungskoeffizienten.

Von viel größerem Einfluß als die vorgeschlagenen Änderungen ist, wie wir finden, bei der künstlichen Verdauung die Aktivität des Ferments, die innerhalb der langen Einwirkungszeit nicht gleichbleibt.

Experimenteller Teil.

Bei der Verdauung der Nahrung unter natürlichen Verhältnissen ist die Fermentsekretion und ihre Aktivierung zur Entfaltung maximaler

Leistungen eine fortlaufende. Legen wir dagegen bei der analytischen Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins eines Futterstoffes die natürlich sich ergänzenden Fermentwirkungen in eine einzige fermentative Beeinflussung zusammen, indem wir für 48 Stunden Einwirkungsdauer anfänglich nur einmal Ferment zufügen, so ist anzunehmen, daß mit dem Fortschreiten der Einwirkungszeit aus diesen oder jenen Gründen die Aktivität des Ferments sich vermindert. Wir haben daher zunächst untersucht, ob durch eine erneute Pepsin-Salzsäurezugabe nach 24 Stunden eine gesteigerte Verdaulichkeit und damit gleichzeitig einheitlichere Ergebnisse zu erzielen sind. Von unseren Beobachtungen sind einige in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

	Substanz	Pepsin	25 %ige HCl	Wasser	Heu	Kakaoschalen	Fleischmehl	Blutfutter	Kartoffelflocken
	g	g	ccm	ccm	%	%	%	%	%
Rohproteingehalt					11,23	16,04	59,54	26,51	6,78
					Davon relativ verdaut in %				
Zugabe zu Beginn	2	1	10	480	66,58	41,47	73,86	84,90	64,55
„ nach 24 Std.			10						
„ zu Beginn	1	1	10	480	68,53	41,95	75,35	90,60	65,13
„ nach 24 Std.			10						
„ zu Beginn	2	1	10	480	73,22	44,58	77,64	93,98	68,70
„ nach 24 Std.		1	10						

Aus Tabelle I ergibt sich, daß durch die erneute Zugabe von 1 g Verdauungsferment nach 24 Stunden erheblich höhere Werte an verdaulichem Rohprotein nach Ablauf der Verdauungszeit erreicht werden, als dies nach der ursprünglichen Methode *Stutzers* und nach deren Abänderung durch *Wewers* der Fall ist. Die Verwendung der doppelten Pepsinmenge bei unserer Modifikation des Verfahrens kann hierbei nicht allein ausschlaggebend gewesen sein, denn das Verhältnis von Substanz- zu Fermentmenge ist das gleiche wie es *Wewers* durch Reduzierung der Einwaage bei Blut- und Fischmehl benutzt hat und wie es von uns zum Vergleich auch auf andere Substanzen ausgedehnt worden ist. Unter unseren Bedingungen zeigen die verschiedensten Kontrollbestimmungen keine der früher beobachteten Differenzen mehr, so daß sich auch aus diesem Grunde die Notwendigkeit der Fermenterneuerung bei der analytischen Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futtermitteln ergibt.

Weiterhin haben wir festgestellt, daß die Erneuerung des Ferments nach 24 Stunden in Verbindung mit der bisher vorgeschriebenen Menge

Salzsäure im Verdauungsgemisch nicht das Wirkungsoptimum herstellt. Das Erreichen höherer Grenzwerte der Verdaulichkeit ist auch von einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration abhängig, die bei den von uns benutzten Verhältnissen bei etwa $p_H = 1{,}1$ zu liegen scheint und während der gesamten Verdauungszeit annähernd aufrechterhalten werden muß. Beobachtungen hierüber bringt Tabelle II.

Tabelle II.

	Substanz g	Pepsin g	18 %ige HCl ccm	Wasser ccm	p_H-Wert	Heu %	Kakaoschalen %	Fleischmehl %
Rohproteingehalt						11,23	16,89	59,54
						Davon relativ verdaut in %		
Zugabe zu Beginn	2	1	10	480	1,1	74,24	45,31	78,44
„ nach 24 Std.		1			1,35			
„ zu Beginn	2	1	15	480	0,90	73,68	44,16	77,60
„ nach 24 Std.		1			1,05			
„ zu Beginn	2	1	6	480	1,7	73,23	44,44	77,36
„ nach 24 Std.		1			1,9			
„ zu Beginn	2	1	10	480	1,1	75,87	47,36	79,27
„ nach 24 Std.		1	10		0,95			
„ zu Beginn	2	1	10	480	1,1	76,30	47,94	79,60
„ nach 24 Std.		1	5		1,1			

Bei den Untersuchungen in Tabelle II wurde eine 18 %ige Salzsäure zur Fermentaktivierung angewendet. Die Pepsinzufuhr bei den einzelnen Bestimmungen war zu Beginn und in der Mitte der Verdauungszeit die gleiche. Die dem Substrat zugegebenen Salzsäuremengen wurden für die Beobachtungen so varriiert, daß sich neben anfänglichen p_H-Werten von 1,1 auch solche von 0,9 und 1,7 ergaben. Während bei einzelnen Bestimmungen der Verlauf der Azidität nicht korrigiert wurde, wurde bei anderen durch erneute Säurezufuhr der Anfangs-p_H-Wert unter 1,1 gedrückt, bzw. über die Zeit der Verdauung erhalten.

Übereinstimmend mit anderen Beobachtern finden wir eine Abnahme der Salzsäurekonzentration im Verlauf der fermentativen Verdauung, die mit der Bindung an Eiweißabbaustoffe im Zusammenhang steht. Größere und kleinere p_H-Werte als 1,1 im Verdauungssubstrat üben jedenfalls einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität des Ferments aus. Aus Tabelle II ist weiter zu entnehmen, daß günstiger liegende Grenzwerte der Verdaulichkeit des Rohproteins nur bei konstantem p_H-Wert 1,1 und unter Verwendung von je 1 g Pepsin pro Tag zu erzielen sind.

Es ist in der Physiologie eine viel beobachtete Tatsache, daß Fermentwirkungen noch durch Metallsalzspuren katalytisch fördernd beeinflußt werden. Wir haben auch festgestellt, daß bei vorbeschriebener

analytischer Methodik zur Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins eines Nahrungsstoffes die relativen Grenzwerte durch Kupferionen noch einige Prozent nach oben verschoben werden. Die Beeinflussung ist um so augenfälliger, je schwerer die Substanzen in Wasser aufquellen. Die Auswirkungen der Oberflächenvergrößerung bei leicht quellenden Substanzen für den Fermentangriff scheinen bei schwer quellbaren Produkten durch eine intensivere Metallionenkatalyse ausgeglichen zu werden. Einige Gegenüberstellungen der methodischen Ergebnisse folgen in Tabelle III.

Tabelle III.

	Substanz g	Pepsin g	HCl ccm	Wasser ccm	p_H-Wert	Heu %	Fleischmehl %	Kakaoschalen %	Kartoffelflocken %
Rohproteingehalt						11,23	59,54	16,89	6,78
						Davon relativ verdaut in %			
Methode *Stutzer*:									
Zugabe zu Beginn	2	1	10 *	480	1,0	66,58	73,86	43,22	64,55
„ nach 24 Std.			10						
Methode *Wewers*:									
Zugabe zu Beginn	1	1	10 *	480	1,0	68,35	75,35	43,87	65,13
„ nach 24 Std.			10						
Methode *Wagner*:									
Zugabe zu Beginn	2	1	150 **		1,1	73,18	77,60	44,36	66,47
„ nach 24 Std.									
Eigene Methode:									
Zugabe zu Beginn	2	1	10 ***	480	1,1	76,30	79,60	47,94	69,40
„ nach 24 Std.		1	5		1,1				
Eigene Methode:									
Zugabe zu Beginn	2	1	10 †	480	1,1	78,37	83,13	51,78	70,87
„ nach 24 Std.		1	5		1,1				

* 25%ige Salzsäure. — ** n 10 Salzsäure. — *** 18%ige Salzsäure. — † 18%ige Salzsäure + 10 Tropfen 5%ige $CuSO_4$-Lösung.

Der Vergleich der bisher bekannten Modifikationen des *Stutzer*schen Verfahrens gegenüber der Originalmethode zeigt nach Tabelle III ohne Zweifel eine Verbesserung des Verfahrens. Die Änderungen stellen aber nach unseren Untersuchungen noch keine endgültige Lösung des methodischen Prinzips dar. Nach der von uns vorgeschlagenen Modifikation der künstlichen Verdauung werden bei Fermenterneuerung und bei konstantem p_H-Wert je nach Futterstoff relativ 8 bis 15% höher liegende Verdauungskoeffizienten erreicht, die sich bei zusätzlicher Verwendung von Spuren von Kupferionen sogar um 10 bis 19% nach oben verschieben. Eine gute Übereinstimmung zeigen die auf vorbeschriebene Weise er-

mittelten Verdauungskoeffizienten für Rohprotein in Futtermitteln auch mit dem Tierexperiment, worauf wir schon kürzlich an anderer Stelle (6) hinwiesen.

Zusammenfassung.

Die maximalen Grenzwerte der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futtermitteln, die mit den tierexperimentell ermittelten übereinstimmen, werden analytisch dann erreicht, wenn bei wiederholter Fermentzugabe und Einhaltung eines gleichbleibenden p_H-Wertes die fermentative Hydrolyse noch durch Spuren von Metallionen katalytisch beeinflußt wird.

Die Arbeitsweise der künstlichen Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futtermitteln schlagen wir daher wie folgt vor: 2 g gemahlene und durch ein $^1/_2$ mm Sieb gegebene Substanz werden in einem geeigneten Gefäß mit 480 ccm Wasser, 10 ccm 18%iger Salzsäure und 1 g käuflichem Pepsin, unter Zusatz von 10 Tropfen einer 5%igen Kupfersulfatlösung, bei Bruttemperatur unter öfterem Umrühren der Verdauung überlassen. Nach 24 Stunden wird dem Verdauungssubstrat erneut 1 g Pepsin und 5 ccm 18%ige Salzsäure zugesetzt und bei gleicher Temperatur die Verdauung fortgesetzt. Nach 48 Stunden wird die unverdaute Substanz von der Flüssigkeit getrennt. Der unverdauliche Rohproteinanteil wird in bekannter Weise ermittelt.

Literatur.

1) *A. Stutzer* in I. König: Unt. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, S. 256. — 2) *G. Kühn*, Landw. Versuchsst. **44**, 188, 1894. — 3) *K. Wedemeyer*, ebenda **51**, 383, 1899. — 4) *H. Wewers*, Zeitschr. f. angew. Chem. **47**, Nr. 50, 822, 1934. — 5) *O. Wagner*, ebenda **48**, Nr. 23, 339, 1935. — 6) *G. Pfeiffer*, Zeitschr. f. Tierernähr., im Druck.

Untersuchungen über das viskosimetrische Verhalten des Fibrinogens.

Von

Edgar Wöhlisch und **Alfons Kiesgen.**

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg.)

(Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.)

(Eingegangen am 8. März 1936.)

Mit 3 Abbildungen.

I. Einleitung.

Die vorliegende Untersuchung steht in engem Zusammenhang mit einer kürzlich veröffentlichten Arbeit aus diesem Institut [*Wöhlisch* und *Belonoschkin* (1)], in der an einer größeren Zahl von Eiweißkörpern mit besonderer Berücksichtigung des Fibrinogens die Frage nach den Beziehungen zwischen *Gans*-Effekt (Depolarisation des *Tyndall*-Lichtes), Strömungsdoppelbrechung und Teilchengestalt des Proteinmoleküls erörtert wurde. Es zeigte sich dabei, daß ein deutlicher Parallelismus der Aussagen der beiden genannten optischen Methoden in dieser Hinsicht offenbar nicht besteht, da die Eiweißkörper mit vermutlich fadenförmiger Gestalt der Moleküle, Myosin (2), Ovoglobulin (3) und Fibrinogen (4) (5) sich zwar durch deutliche Strömungsdoppelbrechung, nicht sicher aber durch den Depolarisationsgrad des von ihren Lösungen ausgestrahlten *Tyndall*-Lichtes von den übrigen Proteinen unterscheiden. Dagegen scheint dem scharfen Unterschied zwischen strömungsdoppelbrechenden und nichtströmungsdoppelbrechenden Proteinen ein ebensolcher Unterschied im viskosimetrischen Verhalten der beiden Proteinklassen zu entsprechen, da man bei den strömungsdoppelbrechenden Solen des Myosins (2) und Ovoglobulins (3) und bei Temperaturen unterhalb von etwa 40^0 auch der Gelatine (6) anomale Viskosität (7), bei den nichtströmungsdoppelbrechenden Lösungen des Ovalbumins (3) und Myogens (8) dagegen normale Viskosität gefunden hat. Ein schönes Beispiel dafür, daß dieser Parallelismus sich nicht nur auf die lyophilen Sole beschränkt, bietet das Vanadinpentoxyd V_2O_5, dessen Sole, wenn sie genügend gealtert sind, anomale Viskosität (9) und Strömungsdoppelbrechung zeigen (10).

Soviel bisher bekannt, scheinen noch einige weitere physikalische Größen kolloidaler Lösungen mit Strömungsdoppelbrechung und anomaler Viskosität vergesellschaftet zu sein: dies sind vor allem die neuerdings als „Spinnbarkeit" bezeichnete Fähigkeit, Fäden zu ziehen (11) und die Eigenschaft der Elastizität (12).

Beim Fibrinogen, das vielleicht das interessanteste Protein des Blutplasmas ist, da es als einziges eine ganz spezifische Funktion zu erfüllen hat, ist die Eigenschaft der Spinnbarkeit sehr ausgesprochen. Strömungsdoppelbrechung wurde hier gleichzeitig von *Wöhlisch* und *Clamann* (4) sowie von *Boehm* (5) nachgewiesen. Ob der daraufhin naheliegende Schluß zutreffend ist, daß dieses Protein mit anomaler Viskosität behaftet sein müsse, das soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Ferner interessierte uns die Frage, wie die Viskosität des Fibrinogens durch gewisse Eingriffe, die dessen Gerinnbarkeit durch Thrombin reversibel oder irreversibel aufheben, beeinflußt wird.

II. Experimenteller Teil.

Die viskosimetrischen Messungen wurden in einem Kapillarviskosimeter nach *Tsuda* (13) ausgeführt. Den Hinweis auf die besondere Eignung dieses Instruments für die Druckviskosimetrie verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Prof. *Wo. Ostwald*.

Flüssigkeiten, die sich im viskosimetrischen Versuch „normal" verhalten, zeigen einen vom angewandten Druck unabhängigen Wert des Koeffizienten der inneren Reibung in der Gleichung von *Poiseuille*

$$\eta = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot p \cdot t}{8 \cdot l \cdot v} \text{ cm}^{-1} \cdot g \cdot \text{sec}^{-1},$$

in der v das in der Zeit t (Sekunden) ausfließende Flüssigkeitsvolumen in ccm, r den Radius, l die Länge der Kapillare in cm und p den Druck in cm H_2O bedeuten. Schreibt man diese Beziehung in der Form

$$\eta = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot p}{8 \cdot l \cdot v/t} = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot p}{8 \cdot l \cdot V},$$

indem man das in der Zeiteinheit ausfließende Volumen $v/t = V$ setzt, so ergibt sich, daß bei Konstanz von r und l, d. h. für ein bestimmtes Viskosimeter, der Quotient p/V ein relatives Maß der Viskosität vorstellt, das bei Flüssigkeiten mit normaler Viskosität bei verschiedenen Werten von p konstant bleibt, beim Vorliegen anomaler Viskosität dagegen mit steigenden Werten von p absinkt, um erst oberhalb eines bestimmten Druckes einen konstanten Wert anzunehmen.

Hinsichtlich der Methodik folgten wir, abgesehen von einer kleinen Vereinfachung der Druckapparatur, den Angaben von *Ostwald* und *Malss* (14). Das *Tsuda*-Viskosimeter besteht aus zwei in 0,01 ccm geteilten horizontal angeordneten Meßpipetten von je 2 ccm Inhalt, die über eine horizontale Kapillare miteinander verbunden sind. Das freie Ende jeder Pipette ist senkrecht zur Ebene der drei Röhren aufgebogen. Der eine aufsteigende Ast ist zur Aufnahme der zu untersuchenden Flüssigkeit trichterartig erweitert, der andere dient zur Befestigung des Druckschlauchs.

Das mit der Untersuchungsflüssigkeit gefüllte Viskosimeter wird vor den Messungen in einem Wasserthermostaten genau horizontal justiert. Sodann

erfolgt die Verbindung des Viskosimeters mit dem Druckgefäß und es wird die Bewegung des Flüssigkeitsmeniskus in einer der Pipetten verfolgt: vermittelst Stoppuhr bestimmt man die zum Durchfließen von 0,05 ccm benötigte Zeit. Die Beobachtung der Flüssigkeitsbewegung geschieht durch eine Fernrohrlupe, die zur Vermeidung parallaktischer Ablesefehler mittels Zahn und Trieb in der Horizontalen parallel zur Pipette mitbewegt werden kann. Wegen weiterer methodischer Einzelheiten sei auf die Arbeit von *Ostwald* und *Malss* verwiesen.

Ist p der in cm H_2O abgelesene Druck, unter dem die Flüssigkeit ausfließt, t die Zeit in Sekunden, die bei dem Druck p für den Durchfluß von 0,05 ccm benötigt wird, so errechnet sich das in der als Zeiteinheit gewählten Minute ausfließende Volum zu

$$V = \frac{0{,}05}{t} \cdot 60 \text{ ccm/Min.},$$

und aus diesem das in unsern Kurven als Ordinate aufgetragene Viskositätsmaß zu

$$\eta = \frac{p}{V}.$$

Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Viskosimetern, *A* und *B*, durchgeführt, nachdem Vorversuche mit Wasser eine völlig befriedigende Konstanz von η in einem weiten Druckbereich ergeben hatten.

Die zu den Versuchen verwendeten Fibrinogenlösungen wurden in der üblichen Weise durch zweimalige Fällung mit Kochsalz aus Pferdeoxalatplasma gewonnen. Auf eine Entfernung des dem Fibrinogen anhängenden Prothrombins durch Ausschütteln mit Tricalciumphosphat nach *Bordet* wurde verzichtet, da in unserem Falle von der Anwesenheit des Prothrombins keine störende Einwirkung zu erwarten war.

Versuch 1.

Verhalten des genuinen Fibrinogens.

Die am 21. Januar 1936 hergestellte Fibrinogenlösung wurde zur Entfernung des Kochsalzüberschusses gegen 0,9%ige NaCl-Lösung dialysiert. Die zur Untersuchung gelangende Lösung enthielt 1,1% NaCl und 0,62% Eiweiß (*Kjeldahl*). Die Viskosität wurde im Viskosimeter A bei den Temperaturen 20,2 und 36,5° gemessen. Zum Vergleich wurde bei den gleichen Temperaturen Wasser gemessen; wir erhielten dabei die Werte:

$$\eta_l = 23{,}8 \ (20{,}2^0 \text{ C}),$$
$$\eta_l = 15{,}9 \ (36{,}5^0 \text{ C}).$$

Die Kurven der Abb. 1 geben das Verhalten dieser Fibrinogenlösung wieder. Der Versuch bestätigte unsere Erwartungen, insofern sich tatsächlich die für anomale Viskosität kennzeichnende Druckabhängigkeit der η-Werte in sehr ausgesprochenem Maße findet. Temperaturerhöhung schränkt den Bereich der Anomalität deutlich ein, da der Anstieg der Viskosität bei 20,2° unterhalb von etwa 4 cm, bei 36,5° erst

unterhalb von etwa 1,5 cm H_2O einsetzt. Die beiden Kurven haben in dieser Hinsicht die größte Ähnlichkeit mit dem von *Ostwald* und *Malss* an verschiedenen sich entmischenden Systemen – z. B. Phenol—Heptan, Benzol—Eisessig—Wasser usw. — aufgefundenen Verhalten.

Die konstanten Grenzwerte der Viskosität dieser Lösung sind

$\eta = 28{,}9$ (20,2° C),
$\eta = 21{,}7$ (36,5° C).

Durch Division mit den entsprechenden Wasserwerten für η erhält man die auf Wasser gleicher Temperatur bezogene relative Viskosität der Fibrinogenlösung:

$\eta_{rel.} = 1{,}23$ (20,2° C),
$\eta_{rel.} = 1{,}36$ (36,5° C).

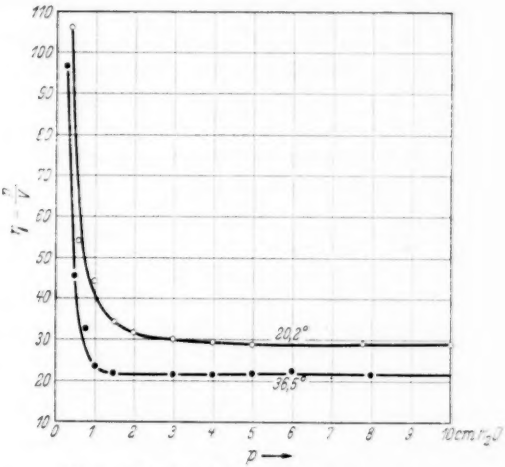


Abb. 1. Viskosimetrisches Verhalten einer genuinen Fibrinogenlösung bei 20,2 und 36,5° C.

Versuch 2.

Einfluß des Harnstoffs auf die Viskosität des Fibrinogens.

Sehr auffallende Veränderungen erfährt eine Fibrinogenlösung durch Harnstoff in höheren Konzentrationen: Man findet eine starke Abnahme der Opaleszenz, ferner einen Verlust der Spinnbarkeit sowie der Gerinnbarkeit durch Hitze, Alkohol und Thrombin. Erscheinungen, die reversibel sind, und über die demnächst in einer anderen Arbeit aus diesem Institut ausführlicher berichtet werden wird.

Um den Einfluß des Harnstoffs auf die Viskosität zu prüfen, wurden 7,0 ccm einer Fibrinogenlösung von 3,26 % NaCl-Gehalt und 0,75 % Eiweißgehalt mit 3,0 g Harnstoff versetzt. Nach der Auflösung betrug das Volumen 9,4 ccm. Zum Vergleich wurden 7,0 ccm

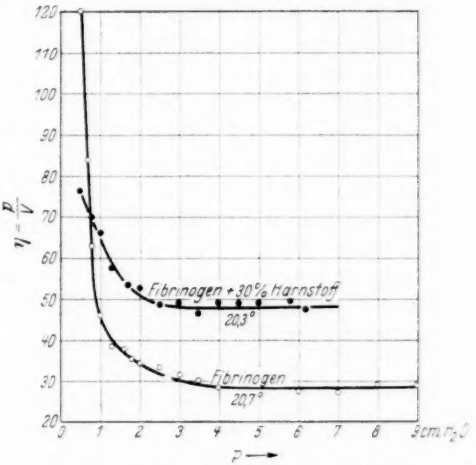


Abb. 2. Viskosimetrisches Verhalten des Fibrinogens ohne und mit Zusatz von Harnstoff.

der gleichen Fibrinogenstammlösung durch Zugabe von 0,9%iger NaCl-Lösung ebenfalls auf das Volumen 9,4 ccm gebracht, so daß die Eiweißkonzentration in der harnstoffhaltigen und harnstofffreien Fibrinogenlösung die gleiche war. Die Ergebnisse der viskosimetrischen Untersuchung dieser Lösungen zeigt Abb. 2.

Wir finden eine beträchtliche Verminderung, wenn auch keine vollständige Aufhebung der Viskositätsanomalie durch den Harnstoffzusatz. Der Grenzwert der Viskosität zeigt einen beträchtlichen Anstieg. Kontrollversuche zeigten, daß dieser nur zum Teil durch die hohe Harnstoffkonzentration an sich, zum andern Teil durch die Veränderung des Fibrinogens zustande kommt.

Versuch 3.

Einfluß der Ätherextraktion auf die Viskosität des Fibrinogens.

Eine der wichtigsten ungelösten Fragen des Blutgerinnungsproblems ist die nach der Fermentnatur des Thrombins. Wird diese bejaht, so entsteht die weitere Frage, ob das Thrombin eine Protease vorstellt, wie dies z. B. *Waldschmidt-Leitz* (15) und *Kühnau* (16) annehmen, oder ob das Thrombin als ein Ferment besonderer Art angesprochen werden muß. Letztere Annahme wird von *Wöhlisch* (17) (18) vertreten, der auf die große Ähnlichkeit der Denaturierungsvorgänge der Eiweißkörper mit der Gerinnung des Fibrinogens durch das Thrombin hinweist und dieses daher als einen *Katalysator der Spontandenaturation des Fibrinogens*, eine *„Fibrinogendenaturase"* ansieht, eine Auffassung, die einstweilen den Charakter einer Arbeitshypothese trägt.

Von *Bancroft* und *Rutzler* (19) wurde nun der sehr merkwürdige Befund erhoben, daß bei Eiereiweiß nach Ätherextraktion die Denaturierbarkeit durch Hitze und Alkohol schwindet. Für die Frage nach der Wirkung des Thrombins war es wichtig zu wissen, ob eine derartige Ätherwirkung auch beim Fibrinogen vorkommt und ob gegebenenfalls gleichzeitig mit der Denaturierbarkeit auch die Thrombingerinnbarkeit aufgehoben wird. In diesem Zusammenhang gewann eine ältere Angabe von *Rumpf* (20) neue Bedeutung, der im Rahmen seiner Untersuchungen über den Einfluß der Lipoide auf die Gerinnung des Blutes nachwies, daß mit Petroläther extrahiertes Plasma die Fähigkeit verliert, durch frisches Serum (Thrombin) zu gerinnen. In Untersuchungen, über die demnächst ausführlich berichtet wird, wurde in unserem Institut gefunden, daß Fibrinogenlösungen durch Ätherextraktion in dem Sinne verändert werden, daß

1. die Denaturierungstemperatur um einige Grade erhöht,
2. die Denaturierung durch Alkohol sehr erschwert und
3. die Angreifbarkeit durch Thrombin, nicht aber die durch hydrolysierende Fermente, aufgehoben wird.

Die durch Ätherextraktion vorbehandelten Fibrinogenlösungen unterscheiden sich von normalen Fibrinogenlösungen außerdem durch etwas stärkere Trübung sowie durch Abnahme oder gar völliges Schwinden der Spinnbarkeit. Dieser Befund gab den Anlaß zur viskosimetrischen Untersuchung einer derartigen Lösung.

Diese wurde aus einer am 27. Januar 1936 hergestellten Pferdefibrinogenlösung durch zweistündiges Schütteln mit dem gleichen Volumen Äther gewonnen. Nach Trennung im Scheidetrichter wurde die wässerige Lösung einige Zeit im Vakuum auf 25 bis 30° zur Entfernung des Ätherrestes erwärmt und sodann wie üblich gegen 0,9 % NaCl dialysiert. Die Lösung hatte einen Eiweißgehalt von 1,09 %, ihr Koagulationspunkt lag bei 57° gegenüber 54° der nicht extrahierten Kontrolle, und es entstand erst bei Zusatz von 0,7 ccm Äthylalkohol auf 1,0 ccm Fibrinogenlösung eine Fällung, während dazu bei der nichtextrahierten Kontrolle nur 0,15 ccm Alkohol nötig waren. Spinnbarkeit und Gerinnbarkeit bei Zusatz einer hochaktiven *Mellanby*-Thrombinlösung fehlten völlig.

Im viskosimetrischen Versuch, der in Abb. 3 wiedergegeben ist, zeigte die Lösung normale Viskosität.

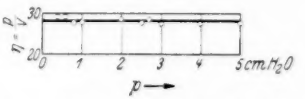


Abb. 3. Viskosimetrisches Verhalten des Fibrinogens nach Extraktion mit Äther.

Zusammenfassung.

Durch kapillarviskosimetrische Untersuchungen an Fibrinogenlösungen bei Variation des Druckes wurde erstmalig eine sehr ausgesprochene anomale Viskosität dieses Proteins nachgewiesen. Dies Ergebnis steht in Übereinstimmung mit anderen Eigenschaften des Fibrinogens, die auf einen fadenförmigen Bau seines Moleküls hindeuten, so vor allem der Spinnbarkeit und der Strömungsdoppelbrechung.

Die Anomalität der Viskosität zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit in dem Sinne, daß sie mit steigender Temperatur abnimmt.

Zusatz von Harnstoff in größeren Konzentrationen erhöht die Viskosität im Bereiche der konstanten η_l-Werte, setzt aber die Anomalität stark herab. Zugleich schwinden die Spinnbarkeit, die Gerinnbarkeit durch Thrombin und andere Kennzeichen des Fibrinogens in reversibler Weise.

Durch Ätherextraktion wird die Viskosität der Lösung normal, zugleich schwinden auch hier Spinnbarkeit und Gerinnbarkeit durch Thrombin, und die Denaturierung durch Alkohol und Wärme wird erschwert.

Schrifttum.

1) *E. Wöhlisch* u. *B. Belonoschkin*, diese Zeitschr. **284**, 353, 1936. — 2) *A. v. Muralt* u. *J. T. Edsall*, J. of biol. Chem. **89**, 315, 351, 1930. —

3) *G. Bochm* u. *R. Signer*, Helv. chim. acta **14**, 1370, 1931. — 4) *E. Wöhlisch* u. *H. G. Clamann*, Zeitschr. f. Biol. **92**, 462, 1932. — 5) *G. Bochm*, Klin. Wochenschr. **1932**, S. 599. — 6) Strömungsdoppelbrechung der Gelatine bei: *A. Kundt*, Wiedemanns Ann. d. Phys. **13**, 110, 1881; *Bernatzky*, J. d. russ. phys.-chem. Ges., phys. T. **37**, 39, 1905; *Björnstahl*, Diss. Uppsala 1924. — 7) Viskosität der Gelatine bei: *Kruyt*, Zsigmondy-Festschr., Erg.-Bd. z. Kolloidzeitschr. **36**, 218, 1925; *Bungenberg de Jong*, Rec. Trav. Chim. **42**, 1, 1923. — 8) *H. H. Weber*, Ergebn. d. Physiol. **36**, 109, 1933. — 9) *H. Freundlich* u. Frl. *Schalek*, Zeitschr. f. physik. Chem. **108**, 153, 1924. — 10) *Dieselhorst, Freundlich* u. *Leonhardt*, Elster-Geitel-Festschr. Braunschweig 1915. — 11) *J. Jochims* in „Filme u. Fäden", Sonderh. d. Kolloidzeitschr. **61**, 250, 1932. — 12) *W. R. Hess*, Kolloidzeitschr. **27**, 154, 1920. — 13) *S. Tsuda*, ebenda **45**, 325, 1928. — 14) *Wo. Ostwald* u. *H. Malss*, ebenda **63**, 61, 1933. — 15) *Waldschmidt-Leitz, Stadler* u. *Steigerwald*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **183**, 39, 1929; Naturwiss. **16**, 1027, 1928. — 16) *I. Kühnau* u. *V. Morgenstern*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **227**, 145, 1934; Naturwiss. **22**, 509, 1934. — 17) *E. Wöhlisch*, Ergebn. d. Physiol. **28** (1, 443, 1929; Naturwiss. 1936, im Druck. — 18) *H. Strughold* u. *E. Wöhlisch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **223**, 267, 1934. — 19) *W. D. Bancroft* u. *I. E. Rutzler*, J. of phys. Chem. **35**, 144, 1931. — 20) *Rumpf*, diese Zeitschr. **55**, 101, 1913.

Reines Cytochrom c.

II. Mitteilung:

Darstellung, Eigenschaften, Ionenbeweglichkeit, Diffusion und Absorptionsspektrum des Cytochroms c.

Von

Hugo Theorell.

(Aus der Chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts, Stockholm.)

(Eingegangen am 5. März 1936.)

Mit 4 Abbildungen.

In einer früheren Mitteilung (1) wurde berichtet, daß es dem Verfasser gelungen ist, das Cytochrom c aus Rinderherzen bis auf einen Eisengehalt von 0.34% zu reinigen. Das damals kurz geschilderte Darstellungsverfahren war jedoch zeitraubend, weil im Laufe der Darstellung zweimal dialysiert wurde; dabei entstanden außerdem unvermeidliche Verluste, teils dadurch, daß Cytochrom teilweise durch die Zellophanmembranen passierte, teils dadurch, daß das Cytochrom aus salzarmen Wasserlösungen in ziemlich großen Mengen an Zellophan adsorbiert wird. Ich habe nun gerade vom letzten Umstand bei der Verbesserung der Darstellung Gebrauch gemacht. Die nunmehr recht einfache Reindarstellung des Cytochrom c aus Herzmuskel gestaltet sich folgendermaßen.

Abschnitt 1. Darstellung von reinem Cytochrom c.

1. 175 Kuhherzen wurden mechanisch von Fett und Bindegewebe so weit wie möglich befreit und gemahlen. Gewicht 181 kg. Jetzt wurde mit Aceton und Benzol entfettet und getrocknet. Das Gewicht des erhaltenen Trockenpulvers betrug 22,7 kg.

2. Das Trockenpulver wurde dreimal mit je 227 Liter Wasser extrahiert. Dabei gingen Verunreinigungen in die Lösung, das Cytochrom bleibt jedoch wenigstens zum größten Teil unextrahiert.

3. Der nach der dritten Wasserextraktion abgenutschte Brei wurde mit 227 Liter n/10 Schwefelsäure angerührt, wobei alles Cytochrom c schnell in Lösung ging. Es wurde sofort, nachdem das Material in der Schwefelsäure gleichmäßig verteilt war, abgenutscht.

4. Die Lösung wurde neutralisiert, vom Niederschlag abfiltriert und auf 11 Liter unter vermindertem Druck eingedampft[1].

[1] Die Reinigungsschritte 1 bis 4 wurden von der Aktiengesellschaft Astra, Södertälje, Schweden, ausgeführt, wofür ich auch hier meinen ergebenen Dank ausspreche.

5. Nachdem die Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf 1,5 Liter eingedampft und von einem geringen Niederschlag abdekantiert worden war, wurden 3 Liter gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Hiernach fiel ein starker, schmieriger, brauner Niederschlag. Das Cytochrom c blieb in der Mutterlauge. Der Niederschlag konnte mit einem Glasstab zu einem überfaustgroßen Klumpen zusammengeknetet werden.

6. Die filtrierte Mutterlauge wurde mit Ammoniumsulfat bei 60° C gesättigt, wobei alles Cytochrom c in großen Flocken ausfiel. Der Niederschlag wurde über ein Seidentuch von der Mutterlauge abfiltriert. Die schwach gelbgrüne Mutterlauge war frei von Cytochrom Der Niederschlag wurde in 1 Liter Wasser gelöst und dann mittels Ammoniumsulfatsättigung bei 60° C umgefällt. Der tiefrote Niederschlag wurde zwischen Filtrierpapier ausgepreßt und so aufbewahrt,. um dann in verschiedenen Portionen weiter gereinigt zu werden. Er erwies sich in dieser Form anscheinend unbegrenzt haltbar. Das Präparat enthielt keine anderen Farbstoffe als Cytochrom c. Die Menge des darin enthaltenen reinen Cytochroms konnte also einfach optisch gemessen werden (vgl. weiter unten). Die Gesamtausbeute betrug nicht weniger als 7,5 g Cytochrom entsprechend $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ Grammatomen Eisen pro 1 kg Herzmuskel. Die meisten für die Darstellung von Cytochrom c in Betracht kommenden Ausgangsmaterialien, wie z. B. Bäckerhefe, enthalten schon von Anfang an weniger. Der Reinheitsgrad des Präparates, von Ammoniumsulfat abgesehen, betrug nach diesem Schritt der Präparation etwa 50 % (0,17 % Eisen). Das Präparat wurde dann in kleineren Portionen weiter gereinigt. Die weitere Reinigung wurde durch Adsorption an Bariumsulfat und an Zellophan durchgeführt.

Das ammoniumsulfathaltige Cytochrompräparat wurde in Wasser gelöst und eine dem Sulfat äquivalente Menge gesättigter Bariumhydratlösung zugesetzt. Dabei wird das Cytochrom c teilweise am Niederschlag adsorbiert. Wenn nötig wurden abwechselnd kleine Mengen von Ammoniumsulfat und von Bariumhydratlösung zugesetzt, bis etwa zwei Drittel des Cytochroms aus der Mutterlauge wegadsorbiert waren. Es erwies sich als ungünstig, das letzte Drittel des Cytochroms zu adsorbieren, da dann unreinere Präparate in schlechterer Ausbeute erhalten wurden. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und das Cytochrom c mit n/50 Salzsäure eluiert. Mit 3 bis 5 Eluierungen wurden durchschnittlich 80 bis 90 % der adsorbierten Cytochrommenge gewonnen.

Es lagen jetzt zwei Fraktionen vor:

A. *Die Mutterlauge* nach der Bariumsulfatadsorption enthielt infolge des Barytzusatzes Ammoniak. Die Lösung wurde bei 10 bis 20° C eingedampft,

bis das Ammoniak verschwunden war. Dann wurde das Cytochrom *c* mit 3 bis 4 Vol. Aceton gefällt, zentrifugiert und das Aceton im Vakuum entfernt, worauf das Präparat eingetrocknet wurde. Die *A*-Präparate waren unreiner als das Präparat vor der Adsorption.

B. *Das an Bariumsulfat adsorbierte* und mit Salzsäure eluierte *Cytochrom c*: Die salzsaure Lösung wurde mit Ammoniak neutralisiert und bei niedriger Temperatur mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Aceton ausgefällt, abzentrifugiert und das Aceton durch Evakuieren entfernt. Die Fällung kann auch bei Zimmertemperatur vorgenommen werden. Dabei entstehen allerdings manchmal kleine Verluste infolge Denaturierung. Auffallenderweise war es unmöglich, das Cytochrom aus der salzsauren Lösung direkt mit Aceton auszufällen; es blieb sogar nach Zusatz des zehnfachen Volumens von Aceton zum großen Teil in der Lösung. Diese Erscheinung stand wohl damit im Zusammenhang, daß das Cytochrom c bei dieser sauren Reaktion in der sauren braunen Form vorliegt, vgl. Abschnitt 5.

Die B-Präparate enthielten 0,24 bis 0,28 % Eisen, d. h. der Reinheitsgrad war 71 bis 82 %.

Die weitere Reinigung wurde entweder durch erneute Adsorption an Bariumsulfat oder an Zellophan ausgeführt.

Eine wiederholte Ammoniumsulfat-Baryt-Adsorption aus einer Lösung, die etwas Phosphat enthielt, ergab ein Präparat mit 0,343 % Eisen. Indessen machte bisweilen nach dieser zweiten Adsorption die Elution mit Salzsäure Schwierigkeiten und ich ging deswegen zu der zuverlässigeren Weiterreinigung durch Adsorption an Zellophan über. Diese wurde so ausgeführt, daß 2 m von einem 25 mm breiten Dialysierschlauch aus Zellophan in Wasser aufgeweicht und dann auf dem Gefriermikrotom klein (5 μ) zerschnitten wurden. Das feine Zellophanpulver wurde dann in eine Nutsche über Filtrierpapier gebracht. Wurde nun eine wässerige Lösung des zu reinigenden Cytochrompräparats durchgesogen, so färbte sich die Zellophanschicht rot durch adsorbiertes Cytochrom. Es wurde mit Wasser nachgewaschen und mit n/2 Ammoniak eluiert. Während die Adsorption momentan verläuft, nimmt die Elution einige Minuten in Anspruch. Es wurde immer dreimal eluiert, wonach die Elution vollständig war. Nach der ersten Adsorption an neuem Zellophan ließ sich das Cytochrom nicht quantitativ eluieren, indem etwa 30 mg am Zellophan zurückblieben. Da indessen dasselbe Zellophan immer wieder zu neuen Adsorptionen verwendet werden konnte, war dieser Verlust ein einmaliger. Dasselbe Zellophan konnte 50 bis 100mal verwendet werden. Jedesmal wurden 25 bis 75 mg Cytochrom erhalten. Die Reinigung von z. B. 1 g Cytochrom erforderte also eine Mehrzahl von wiederholten Operationen. Es erwies sich als günstig, das zuletzt aus der Lösung adsorbierte und eluierte Cytochrom nicht

mit dem zuerst gewonnenen zu vereinigen, da dieses schon rein oder nahezu rein war, während das letzte Drittel oder Viertel etwas unreiner erhalten wurde.

Die ammoniakalische Cytochromlösung wurde direkt in einen eisgekühlten Kolben abgesogen. Die vereinigten Eluate konnten so ohne Gefahr mehrere Stunden kalt aufbewahrt werden, bis sie im Vakuum auf kleines Volumen eingeengt wurden. Zuletzt wurde in kleinen Schalen im Vakuum über Schwefelsäure zur Trockne eingedampft. Die mit der beschriebenen Methode erhaltenen Präparate wiesen einen Eisengehalt von 0,33 bis 0,34 % auf. Der Stickstoffgehalt war durchschnittlich 14,4 %.

Präparationen von Cytochrom c mit anderen Methoden.

1. Cytochrom c wurde aus *Pferdeherzfleisch* nach der in Mitteilung I angegebenen Methode, bis zur Ammoniumsulfatreinigung, dargestellt. Das Präparat zeigte nach diesem Schritt den Reinheitsgrad 64 %. Dann wurde folgendermaßen weitergereinigt: Das Präparat wurde in 40 ccm Wasser, 1 ccm m/4 sek. Phosphat + 0,25 ccm m/4 prim. Phosphat gelöst; dann wurden 80 ccm gesättigte Pikrolonsäurelösung hinzugesetzt. Da die Fällung des Cytochroms unvollständig war, wurde auf 10 ccm eingeengt, wobei die Hauptmenge des Cytochroms als Pikrolonat ausfiel. Der abzentrifugierte und einmal mit Wasser gewaschene Niederschlag wurde im Hochvakuum eingetrocknet, dann mehrmals mit wasserfreiem Pyridin gewaschen, wobei die tiefrote Farbe des Cytochroms zurückkehrte. Nach dem Abdampfen des Pyridins im Hochvakuum wurde das Cytochrom in Wasser gelöst und zusammen mit etwas ungelöstem Cytochrompikrolonat über Nacht dialysiert. Das Ungelöste ging beim Herausdialysieren der Pikrolonsäurereste in Lösung. Das Präparat enthielt 0,345 % Fe, 14,5 % N.

Diese Reinigungsmethode wurde verlassen wegen der Gefahr, daß z. B. bei Anwesenheit von Wasserspuren das Pyridin mit dem Eisen-Porphyrin in bekannter Weise reagieren könnte.

2. Ein Cytochrompräparat mit 0,17 % Eisen wurde aus Wasserlösung mit Pikrolonsäure und Natriumpikrolonat gefällt. Der Niederschlag wurde in Borat-Pufferlösung, p_H 10, gelöst und gegen fließendes Wasser dialysiert, bis keine Pikrolonsäure mehr in der Außenflüssigkeit erschien. Das Präparat enthielt dann 0,30 % Fe. Es wurde nun der Kataphorese bei p_H 7,30 im „Apparat für Untersuchungszwecke" (2) unterworfen. Dabei wanderte das Cytochrom c gegen die Kathode (vgl. Abschnitt 3). Im Anodenschenkel erschien wieder Pikrolonsäure, und zwar in einem Verhältnis von zwei Molekülen Pikrolonsäure pro ein Fe. Das im Kathodenschenkel aufwärtsgewanderte Cytochrom c war rein; es wurde für die Aufnahme des Absorptionsspektrums (siehe Abb. 3 und 4) verwendet.

3. Präparate, die durch Sättigung mit Ammoniumsulfat bei 60° gereinigt und dialysiert waren, konnten durch Kataphorese, entweder im „Apparat für Untersuchungszwecke" (2) oder im „Apparat für präparative Zwecke" (3) vollkommen rein erhalten werden. Bei z. B. p_H 7,30

(Phosphatpuffer 3 Teile sek., 1 Teil prim.) wanderte nur noch das Cytochrom kathodisch.

Bei den hier in Frage kommenden, ziemlich kleinen Substanzmengen konnte der „Untersuchungsapparat" durch einen einfachen Kunstgriff präparativ verwendet werden: die unterste Hartgummischeibe wurde herausgenommen und auf der einen Seite an Stelle der Hartgummischeibe ein Diaphragma aus Filtrierpapier gesetzt; auf der anderen Seite stand die unterste Zelle unmittelbar mit dem U-Rohr in Verbindung. Die Cytochromlösung wurde auf das Diaphragma geschichtet, so daß sie die drei Zellen 4 bis 6 ausfüllte. Im übrigen wurde der Apparat mit Phosphatpufferlösung vom p_H 7,30 gefüllt, s. Abb. 1.

Der Strom wurde so angelegt, daß das Cytochrom abwärts durch das Filtrierpapier ins U-förmige Bodenstück wanderte, während die Verunreinigungen nach oben gingen. Das erhaltene Präparat enthielt 0,31 % Fe, war also noch nicht ganz rein. Am besten ist es, die Reinigung in einer Pufferlösung von p_H 9 vorzunehmen. Dann wandert das Cytochrom mit unverminderter Ionenbeweglichkeit kathodisch (vgl. Abschnitt 3), während die Verunreinigungen bei diesem hohen p_H alle anodisch wandern.

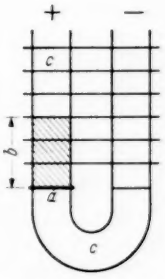


Abb. 1. a) Diaphragma aus Filtrierpapier; b) Lösung von Cytochrom c; c) Pufferlösung. Wanderungsrichtung des Cytochroms: Abwärts.

Es ist mir trotz vieler Versuche nicht gelungen, das Cytochrom c einwandfrei zu kristallisieren; kristallähnliche Gebilde, die jedoch nicht doppelbrechend waren, erhielt ich durch Dialyse gegen Ammoniumsulfat. Es ist ja sehr wohl möglich, daß analog den Verhältnissen beim Hämoglobin und beim Myoglobin gerade das aus Rinderherzen stammende Cytochrom c besonders schwer kristallisiert. Indessen blieb auch ein Versuch mit aus Pferdeherzen gewonnenem Cytochrom c erfolglos.

Abschnitt 2. Chemische Eigenschaften des reinen Cytochroms c.

Das Cytochrom c enthält C, H, O, N, S und Fe, aber keinen P. Die analytische Zusammensetzung eines durch Zellophanadsorption gereinigten Präparates war:

C 49,18 %, H 7,33 %, N 14,4 %, S 1,18 %, Fe 0,34 %, O 27,5 %.

Analysen.

4,538 mg gaben 8,005 mg CO_2, 2,910 mg H_2O, 0,093 mg Rest: 49,13 % C, 7,33 % H.

4,608 mg gaben 8,170 mg CO_2, 2,960 mg H_2O, 0,080 mg Rest: 49,23 % C, 7,32 % H.

4,020 mg gaben (Mikro-*Kjeldahl*) 0,575 mg N: 14,30 % N.

4,511 mg gaben (Mikro-*Kjeldahl*) 0,656 mg N: 14,57 % N.

24,9 mg gaben (*B. Josephson*, unveröffentlichte Methode) 0,310 mg S: 1,24 % S.

9,95 mg gaben (*B. Josephson*, unveröffentlichte Methode) 0,111 mg S: 1,12 % S.

Der Gehalt an Fe wurde durch Lichtabsorptionsmessung ermittelt.

Das Cytochrom c ist sehr stabil. Man kann es in eingetrocknetem Zustande anscheinend unbegrenzt lange aufbewahren, ohne daß es seine gute Wasserlöslichkeit verliert. Man kann es sowohl in normaler HCl als auch in NaOH lösen ohne es zu zerstören. Zu einer Lösung in n HCl gab ich einmal nach 5 Stunden bei Zimmertemperatur das zehnfache Volumen Aceton, wonach der Farbstoff zum Teil ausfiel. Der Niederschlag wurde in Phosphatpuffer gelöst und mit Natriumhydrosulfit versetzt. Dabei traten die Farbe und die Absorptionsbanden des reduzierten Cytochroms c unverändert auf. Dagegen wird es durch Zugabe von Aceton zu einer alkalischen Lösung denaturiert. Man kann Cytochrom c ohne Gefahr aus neutraler, etwas neutralsalzhaltiger Lösung in der Kälte mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Aceton quantitativ fällen; bei Zimmertemperatur wird dagegen oft etwas durch Acetonfällung denaturiert. Es wird aus salzfreier Lösung durch Aceton nicht gefällt, sondern bei der Acetonzugabe entsteht eine kolloidale Lösung. Ebenso ist das Verhalten gegen Methyl- und Äthylalkohol. Die Löslichkeit von Cytochrom c ist in Mischungen dieser Lösungsmittel mit Wasser stark temperaturabhängig, in der Kälte viel geringer als bei Zimmertemperatur. In salzarmer Lösung kann Cytochrom ohne Gefahr auf 100° C erhitzt werden. In gesättigter Ammoniumsulfatlösung beginnt es dagegen bei 70° C zu koagulieren.

Abschnitt 3. Untersuchungen mit Hilfe der Kataphorese.

In der ersten Mitteilung wurde der isoelektrische Punkt von Cytochrom c bei p_H 9,7 angegeben. Tatsächlich liegt er nach genauester Nachprüfung im „Apparat für Untersuchungszwecke" (2) noch etwas höher, bei p_H 9,82 in Boratpuffer, bei p_H 9,86 in Glykokoll-Natronlaugepuffer. Die zu den Kataphoresen verwandten Präparate enthielten im allgemeinen sowohl reduziertes wie oxydiertes Cytochrom c, bisweilen auch ausschließlich das letztere. Es konnten keine sicheren Unterschiede der Wanderung der beiden Formen bei der Kataphorese beobachtet werden.

Tabelle I.

Nr.	p_H	Puffer	$\varkappa \cdot 10^3$	Stromstärke in Milliampere	Zeit der Wanderung in Sek.	Richtung der Wanderung	cm Wanderung Kathodenseite	cm Wanderung Anodenseite	Ionenbeweglichkeit $\frac{qcm}{Sek. . Volt}$
1	4,99	HAc, NaAc	1,47	5,5	7 800	kathodisch	2,03	1,77	$-13 \cdot 10^{-5}$
2	5,65	HAc, NaAc	1,44	5,0	7 620	„	1,11	1,13	− 8,4
3	6,69	Phosphat	1,17	4,5	14 400	„	1,56	1,45	− 5,4
4	7,30	„	1,42	5,0	20 400	„	1,81	1,84	− 5,1
5	7,30	„	1,31	4,7	20 820	„	1,87	1,87	− 5,0
6	8,76	Borat, HCl	1,30	5,0	14 940	„	1,30	1,30	− 4,7
7	9,33	Glykokoll, NaOH	1,32	4,5	12 600	„	0,90	0,84	− 4,1
8	9,39	Borat, NaOH	0,94	3,5	8 640	„	0,82	0,73	− 4,8
9	9,87	„ „	1,21	4,0	21 120	anodisch	0,40	0,41	+ 1,1
10	9,92	Glykokoll, NaOH	1,63	5,0	26 300	„	0,35	0,44	+ 1,0
11	10,68	Phosphat	1,70	5,0	21 600	„	1,93	2,20	+ 6,5

Die Abhängigkeit der Ionenbeweglichkeit des Cytochroms c vom p_H ist durch die Abb. 2 graphisch dargestellt.

Der Verlauf der Kurve in der Abb. 2 zeigt eine bei einem Eiweißkörper noch nie beobachtete Form. Im ganzen Gebiet zwischen p_H 7,0 und p_H 9,3 ist die Ionenbeweglichkeit *unabhängig* von p_H-Unterschieden und beträgt $5 \cdot 10^{-5}$*. Dies bedeutet mit anderen Worten, daß durch Änderungen des p_H-Wertes zwischen p_H 7,0 und p_H 9,3 überhaupt keine sauren oder basischen Gruppen in ihrer Dissoziation verändert werden; vielmehr ist in demselben Gebiet eine gleichstarke basische Ladung vorhanden. Es ist zunächst unmöglich zu entscheiden, ob diese basische Ladung dem Eisen-Porphyrin oder der Eiweißkomponente zugehört. Indessen nehmen *Zeile* und *Piutti* (5) an, daß eine stickstoffhaltige Base im Cytochrom-Porphyrin vorhanden ist. Offenbar könnte der zwischen p_H 7 und p_H 9,3 konstante, basische Charakter des Cytochroms c von einer derartigen Base bedingt sein. Indessen kann selbstverständlich die negative Ladung genau so gut aus anderen Teilen des Moleküls herrühren.

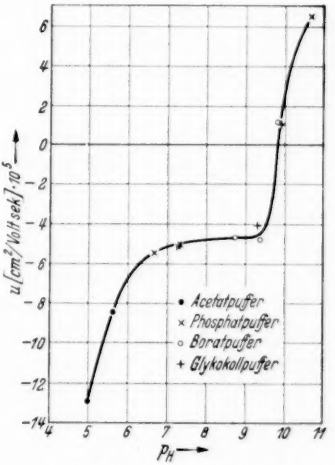


Abb. 2. Ionenbeweglichkeit des Cytochroms c bei variiertem p_H.

Es wurde die Möglichkeit untersucht, ob sich die Anzahl der basischen Gruppen im Gebiet mit $u = 5 \cdot 10^{-5}$ berechnen ließe. Die theoretischen Grundlagen für eine derartige Berechnung für kolloide Partikelchen sind noch recht unklar, vgl. hierüber *Tiselius* [(6), S. 84]. Für das Cytochrom standen folgende Daten zur Verfügung: Mol.-Gew. = etwa 16500*, Sedimentationskonstante = etwa $2 \cdot 10^{-13}$**, Spez. Volumen des Cytochroms 0,707 (bestimmt vom Verfasser). Ohne

* *K. Zeile* (4) hat die Kataphorese des Cytochroms c aus Hefe untersucht; leider hat er aber gerade in dem interessanten Gebiet zwischen p_H 7,5 und 9,55 keine Bestimmungen ausgeführt, wodurch ihm die wohl auch in diesem Cytochrom c nachweisbare merkwürdige S-Form der Kurve entgangen ist. Auf Grund dieser Form erscheint die Richtigkeit des von *Zeile* durch Interpolation zwischen p_H 7,5 und 9,55 gefundenen Wertes des isoelektrischen Punktes bei p_H 8,2 als sehr fraglich. — ** Persönliche, vorläufige Mitteilung von Dr. *K. O. Pedersen* aus *The Svedbergs* Institut in Upsala. Das Molekulargewicht würde also dem aus dem Eisengehalt berechneten Minimalwert entsprechen.

Korrektion für den Einfluß der die Partikelchen umgebenden Ionen wurde die scheinbare Ladung zu 1,3 Elementarladungen pro Partikelchen gefunden (s. *Tiselius*). Dieser Wert ist nun nach der Theorie von *Debye* und *Hückel* sicher zu niedrig. Am wahrscheinlichsten entspricht die Ionenbeweglichkeit $5 \cdot 10^{-5}$ beim Cytochrom c *zwei* Elementarladungen pro Molekül.

Der niedrige Stickstoffgehalt von 14,4 % ist zunächst im Vergleich mit dem außerordentlich weit im Alkalischen gelegenen isoelektrischen Punkt überraschend. Wenn aber die Lage des I. P. nicht auf basischen Aminosäuren der Eiweißkomponente, sondern auf den basischen Gruppen im Porphyrin beruht, ist der Widerspruch nur scheinbar.

Abschnitt 4. Freie Diffusion des Cytochroms c.

Zeile und *Reuter* (7) untersuchten die Diffusionsgeschwindigkeit des Cytochroms c aus Hefe. Die von ihnen gefundenen Werte deuteten indessen auf ein unwahrscheinlich hohes Molekulargewicht von 86500 bis 185000. Meine Diffusionsbestimmungen wurden im „Kataphoreseapparat für Untersuchungszwecke" ausgeführt, wobei die früher (8) beschriebene Technik Anwendung fand. Es wurde ein durch Cellophanadsorption gereinigtes Präparat mit einem Eisengehalt von 0,342 % in Wasser gelöst, und zwar 5,13 mg pro 1 ccm Lösung. Die drei untersten Zellen des Apparates wurden mit der Cytochromlösung gefüllt; dann wurde Wasser in den drei oberen Zellen wie üblich über die Cytochromlösung geschichtet. Temperatur 20,0°. Zeit 5 Tage (120 Stunden). Nach dieser Zeit wurden alle Zellen durch Drehen der Hartgummischeiben voneinander getrennt. Der Inhalt jeder Zelle wurde in zwei verschiedenen Weisen analysiert: durch Bestimmung der Farbstoffmenge im Stufenphotometer (s. Abschnitt 5, 2) und durch Eintrocknen abpipettierter Mengen in tarierten Wägegläschen zu konstantem Gewicht. Die Wägegläschen konnten nur auf zehntel Milligramm sicher gewogen werden. Da jedesmal 2 ccm eingetrocknet wurden, sind also die für 1 ccm angegebenen Werte mit einer Unsicherheit von 0,05 mg behaftet. Eine annähernd quantitative Bestimmung des Cytochroms c läßt sich besonders einfach mit dem Pulfrich-Photometer ausführen. Bei Verwendung des Spektralfilters S 53 ist nämlich die Lichtabsorption vom Verhältnis zwischen der oxydierten und reduzierten Form in dem zu untersuchenden Präparat praktisch unabhängig, und zwar ist $\log I_0/I$ bei $d = 1$ cm und 1 γ Cytochromeisen pro 1 ccm = 0,218.

Tabelle II.

Zelle	mg/ccm nach Wägen	mg/ccm nach Stupho	Zelle	mg/ccm nach Wägen	mg/ccm nach Stupho
1	0,08	0,07	4	3,56	3,52
2	0,43	0,39	5	4,76	4,74
3	1,58	1,53	6	5,10	5,13

Die Berechnung des Diffusionskoeffizienten (8) ergab: $D_{20^0} = 11{,}1 \cdot 10^{-7}$ qcm/Sek. Eine zweite Bestimmung ergab $D_{20^0} = 11{,}2 \cdot 10^{-7}$. Dieser Wert steht mit dem angenommenen *Molekulargewicht von 16500* in bestem Einklang. Die photometrische und gravimetrische Bestimmung gab innerhalb der Fehlergrenze identische Werte in allen Zellen. Es ist dies eine weitere, starke Stütze für die Annahme, daß das Präparat wirklich chemisch reines Cytochrom c ohne irgendwelche Beimengungen war.

Abschnitt 5. Absorptionsspektrum des Cytochroms c.

1. Das reduzierte Cytochrom c. Ein durch Pikrolonsäurefällung und durch Kataphorese rein dargestelltes Präparat wurde mittels Pt-Mohr und Wasserstoff (1) quantitativ reduziert und die Absorption der erhaltenen Lösung im Ultraviolett lichtelektrisch gemessen. Diese Reduktionsmethode war die einzig mögliche, weil andere in Frage kommende Reduktionsmittel, wie z. B. Natriumhydrosulfit, selbst Lichtabsorption im Ultraviolett zeigen. Im sichtbaren Gebiet bestand diese Gefahr nicht. Darum konnte hier eine Lösung mit Überschuß an Hydrosulfit gemessen werden. Dies ist vorteilhaft, weil dann keine Oxydation des Cytochroms während der Messung zu befürchten ist. Allerdings stellte sich heraus, daß diese Vorsichtsmaßnahme unnötig war, weil die für die Messung im Ultraviolett in der oben angegebenen Weise dargestellte Lösung während der Messungszeit keine nachweisbare Autoxydation zeigte. Die Geschwindigkeit der Autoxydation nach Reduktion mit Platin und Wasserstoff wechselt indessen bei verschiedenen Präparaten. Die durch Adsorptionsmethoden gereinigten Präparate zeigten immer eine viel größere Autoxydationsgeschwindigkeit als die durch Kataphorese gereinigten. Offenbar werden also durch die Kataphorese irgendwelche katalytisch wirkenden Beimengungen entfernt. Die erhaltenen Resultate gehen aus der Tabelle III und aus der Abb. 3 hervor.

Das Spektrum im Sichtbaren stimmt so ziemlich mit dem von *Keilin* (9) für das Hefecytochrom c bestimmten überein. Die Höhen

Tabelle III. Sichtbares Gebiet.

Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right] \cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right] \cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right] \cdot 10^{-7}$
600	0,17	525	3,17	460	0,77
590	0,17	520	3,89	450	1,09
580	0,20	515	3,36	440	3,15
570	0,34	510	2,14	430	3,45
560	1,10	500	0,99	420	26,8
550	6,47	490	0,83	415	33,0
540	2,33	480	0,78	410	26,6
530	2,42	470	0,72	400	13,1

Tabelle IV. Ultraviolettes Gebiet.

Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$
400	13,0	350	4,65	300	5,40	250	6,27
390	7,38	340	5,20	290	5,40	240	7,86
380	5,07	330	6,21	280	6,67	230	24,0
370	4,02	320	7,68	270	6,79	220	39,0
360	3,97	310	7,30	260	6,20		

und die Lagen der Maxima bei 550, 520 und 415 mμ scheinen vollkommen identisch zu sein. Dagegen liegt die vom Verfasser gefundene Kurve zwischen den Maxima, z. B. bei 540 und 470 mμ, bedeutend niedriger als die von *Keilin* bestimmte. Interessant ist das Absorptionsspektrum im Ultraviolett, dessen Bestimmung ja erst nach der Reindarstellung möglich war; es enthält drei Banden, eine schwach angedeutete bei 345 mμ, eine kräftige bei 316 mμ und noch eine bei 275 mμ. Die beiden ersten stammen vom Eisen — „unmodifizierter Porphyrin c"-Komplex, während die Bande 275 mμ der Eiweißkomponente angehört.

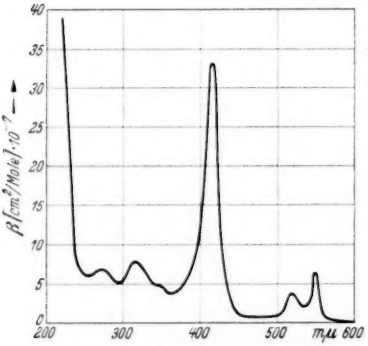


Abb. 3. Absorptionsspektrum des reduzierten Cytochroms c.

II. Das oxydierte Cytochrom c. Vollständig oxydiertes Cytochrom c wurde so dargestellt, daß zu einer Lösung eines reinen Präparates zuerst HCl bis n/100 zugesetzt wurde, wobei bekanntlich schnelle Autoxydation erfolgt. Nach vollendeter Oxydation durch Luftsauerstoff wurde neutralisiert.

Tabelle V. Sichtbares Gebiet.

Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$
640	0,58	550	2,20	470	2,50
630	0,59	540	2,52	460	3,07
620	0,63	530	2,75	450	3,97
610	0,63	520	2,50	440	4,95
600	0,71	510	1,99	430	7,10
590	0,79	500	1,73	420	13,3
580	1,12	490	1,83	410	25,7
570	1,43	480	2,10	400	20,9
560	1,82				

Tabelle VI. Ultraviolettes Gebiet.

Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$	Wellenlänge mμ	$\beta\left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mole}}\right]\cdot 10^{-7}$
400	19,6	350	6,68	300	3,81	260	6,00
390	11,9	340	5,70	290	5,38	250	6,60
380	8,52	330	5,05	280	6,37	240	9,40
370	7,27	320	4,55	270	6,20	230	26,1
360	7,25	310	4,05				

Hier zeigt sich im Sichtbaren die flache Bande bei 520 bis 550 mμ und die Hauptbande, die für die oxydierte Form bei 407 mμ liegt. Im Ultraviolett finden sich zwei Banden, bei 364 und 276 mμ. Die „Eiweißbande" 275 mμ des reduzierten Cytochroms bleibt bei der Oxydation praktisch intakt; dagegen ändert sich das übrige Oxydationsspektrum ganz bedeutend.

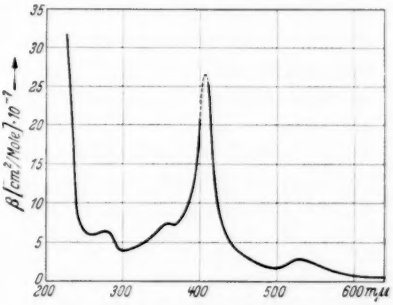


Abb. 4. Absorptionsspektrum des oxydierten Cytochroms c bei neutraler Reaktion.

Bekanntlich treten Methämoglobin und Metamyoglobin sowohl in sauren wie in alkalischen Formen auf, die verschiedene Banden im Spektrum bedingen. Beim Cytochrom c liegen die Verhältnisse indessen noch komplizierter. Bringt man nämlich eine Lösung von oxydiertem Cytochrom auf ein p_H unterhalb etwa 2,5, wird die vorher rote Lösung rein braun und zeigt im Spektroskop nunmehr bloß eine sehr diffuse Bande bei 515 bis 545 mμ. Die Veränderung ist glatt reversibel; das Cytochrom c verhält sich also wie ein Indikator. Die Dissoziationskonstante ist 10^{-3}.

Bringt man dagegen eine Lösung von oxydiertem Cytochrom c auf ein p_H oberhalb 13, so zeigt die Lösung ein zweibandiges Spektrum 570 bis 580 und 525 bis 545 mμ. Dieser Umschlag ist ebenfalls glatt reversibel, und die Dissoziationskonstante liegt in der Gegend von 10^{-13}. Das oxydierte Cytochrom c tritt also in einer sauren, einer Zwischenform und einer alkalischen Form auf. In dem p_H-Bereich der „sauren" und der „alkalischen" Modifikation des oxydierten Cytochroms c ist nun, wie *Keilin* (9) nachwies, das reduzierte Cytochrom autoxydabel. Die Geschwindigkeit dieser Autoxydation ist, wie Verfasser fand, sehr stark p_H-abhängig. Bei Zimmertemperatur und p_H 3 war die Oxydation nach 4 Minuten vollständig, bei p_H 2 schon nach 10 Sekunden. Bei dem alkalischen Umschlagspunkt liegen analoge Verhältnisse vor.

Zusammenfassung.

1. Es werden verschiedene Reinigungsmethoden des Cytochroms c aus Herzmuskeln beschrieben. Alle führten zu identischen Präparaten. Die Eigenschaften des reinen Cytochroms c werden erörtert.

2. Bei quantitativen Kataphoresebestimmungen stellte sich heraus, daß das Cytochrom c aus Herzmuskeln bei p_H 9,82 bzw. 9,86 in Borat-, bzw. Glykokollpuffer isoelektrisch ist. Zwischen p_H 7 und 9,3 zeigt es eine konstante, kathodische Ionenbeweglichkeit von $5 \cdot 10^{-10}$ qcm/Volt/Sek.

3. Bei fraktionierter Diffusion herrschte strenge Proportionalität zwischen Farbe und Trockensubstanz. Die chemische Reinheit des Präparates wurde dadurch noch weiter bestätigt. Die Diffusionsgeschwindigkeit stimmt zu dem aus dem Eisengehalt berechneten minimalen Molekulargewicht von etwa 16500.

4. Die absoluten Lichtabsorptionskurven von reduziertem und oxydiertem Cytochrom c zwischen 220 und 640 mμ werden angegeben. Das oxydierte Cytochrom c tritt in Wasserlösung, je nach der Wasserstoffionenkonzentration, in drei spektroskopisch verschiedenen Formen auf.

Literatur.

1) *H. Theorell*, diese Zeitschr. **279**, 463, 1935. — 2) *Derselbe*, ebenda **275**, 1, 1934. — 3) *Derselbe*, ebenda **278**, 291, 1935. — 4) *K. Zeile*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **235**, 212, 1935. — 5) *K. Zeile* u. *P. Piutti*, ebenda **218**, 52, 1933. — 6) *A. Tiselius*, Nova Acta Reg. Soc. Sc. Upsaliensis, IV, Vol. 7, No. 4. — 7) *K. Zeile* u. *F. Reuter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **221**, 101, 1933. — 8) *H. Theorell*, diese Zeitschr. **275**, 19, 1934. — 9) *D. Keilin*, Proc. Roy. Soc. B, **106**, 418, 1930; Ergebn. d. Enzymforschung **2**, 239, 1933.

Nachtrag bei der Korrektur. Es ließ sich denken, daß der niedrige Stickstoffgehalt und der niedrige Wert für das spezifische Volumen darauf beruhen könnte, daß das Cytochrom c Polysaccharid enthielte. Indessen erschien nach saurer Hydrolyse nur etwa 3% reduzierender Zucker. Es darf keineswegs als sicher betrachtet werden, daß diese kleine Zuckermenge aus dem Cytochrommolekül stammte; jedenfalls ist die Menge viel zu klein, um Stickstoffgehalt und spezifisches Volumen wesentlich zu beeinflussen. Glucosamin war überhaupt nicht vorhanden (Analyse von Prof. *G. Blix*).

Stoffwechseluntersuchungen an Aspergillus niger.

I. Mitteilung:

Einfluß von Phytin auf Stoffwechselvorgänge von Aspergillus niger.

Von

W. Braun und **A. Frey.**

(Eingegangen am 17. Februar 1936.)

Im Rahmen der von *W. Braun* begonnenen Untersuchungen über den Phosphorstoffwechsel von Hefen, welche insbesondere die physiologische Bedeutung des Phytins behandeln, zogen wir neben anderen Mikroorganismen auch Aspergillus niger zur Untersuchung heran. Der selektive Einfluß von Phytin auf den Atmungsstoffwechsel von Hefe ließ insofern Aspergillus niger für eine derartige Untersuchung als besonders geeignet erscheinen, als hier Atmung und Gärung eng verbunden zusammenhängen und bei demselben Versuch durch das Mycelgewicht und die Säurebildung erfaßbar sind, während bei Hefeversuchen die Versuche getrennt in Nacharbeitung der technischen Prinzipien der Brennerei bzw. der Preßhefefabrikation zu erfolgen haben.

Auf eine Erörterung der außerordentlich wichtigen physiologischen Rolle von Phytin in der höheren Pflanze kann hier nicht eingegangen werden. Nur soviel soll hier bemerkt werden, daß die Funktion des Phytins in der höheren Pflanze, die nach unserer Ansicht in seinen hydrotropischen Eigenschaften, der Löslichmachung und dem Transport an sich schwer löslicher Körper besteht, hier nicht in Betracht zu ziehen ist, da die morphologischen Voraussetzungen für diese Wirkungsweise fehlen.

Über die Art und Menge des Phosphors besteht bereits eine gewisse Zahl von Untersuchungen, so besonders von *Herzog* und *Polotzky*[1] und *Bernhauer* und *Wolf*[2]. Auch das *Bleyer*sche Patent, DRP. Nr. 434673, erwähnt die Wichtigkeit des Phosphorstoffwechsels, ohne daß hier jedoch genauere Einzelheiten erwähnt wären. Auch ist uns bisher keine weitere experimentelle Arbeit des letzteren bekannt geworden, welche dieses Problem bei Aspergillus niger weiter verfolgt hätte. Phytin als Phosphorquelle ist in keiner dieser Untersuchungen bisher herangezogen worden, sondern nur verschiedene Formen von anorganischen Phosphorsalzen.

---

[1] *Herzog* u. *Polotzky*, Hoppe-Seyler **59**, 125, 1909. — [2] *Bernhauer* u. *Wolf*, ebenda **177**, 271, 1928.

Experimentelle Methodik.

Zuckerbestimmung: Nach *Kjeldahl-Bertrand*, Auswertung nach der Tabelle von *Braun*[1].

Titrationsazidität: In je 10 ccm mit Phenolphthalein als Indikator.

Citronensäurebestimmung: Nach *Stahre-Kunz*, Modifikation *Frey*[2].

Gesamtphosphor: Durch nasse Veraschung nach *Neumann*, Fällung als Ammoniumphosphormolybdat und Bestimmung als Magnesiumpyrophosphat.

Anorganischer Phosphor: Der anorganische Phosphor neben Phytinphosphor wurde nach den Angaben von *W. Braun* folgendermaßen bestimmt: 30 ccm Phosphorsäurelösung und 20 ccm konz. Salpetersäure werden auf 50° erhitzt, mit 30 ccm kaltem Molybdänreagens versetzt und die Fällung 2 bis 18 Stunden stehengelassen. Dekantieren durch ein Filter und Lösen in 10 ccm $2^1/_2$ %igem Ammoniak. Nach vorsichtigem Versetzen mit 10 % HCl bis zum Entstehen eines Niederschlags werden je 10 ccm gesättigte Ammonchloridlösung und Magnesiamixtur zugegeben und die Fällung des Magnesiumammoniumphosphats in der üblichen Weise durchgeführt.

Mycelgewichtsbestimmung: Nach mehrmaligem Auswaschen wird das Mycel zuerst mehrere Stunden bei 50°, dann über Nacht bei 80° und zum Schluß noch 4 Stunden bei 105° getrocknet.

Wasserstoffionenkonzentration: Mit dem Ionometer nach *Lüers*

Allgemeine Versuchsdaten.

Stamm: Aspergillus niger Stamm St, durch besonderes Verfahren gezüchtet. Versuchsdauer: 27 Tage; Zuckerlösung: 15 % Saccharose, je 200 ccm; Temperatur: 25°, bzw. 30° nach den ersten 8 Tagen; Pilzoberfläche: 71 cm; Flüssigkeitshöhe: 2,6 cm; Versuchsgefäße: 500 ccm-*Erlenmeyer*kolben aus Fischerglas.

Nährsalzlösung:

I. 100 g NH_4NO_3,
10 g KNO_3,
2 g $MgSO_4$.

II. 15 g Asparagin,
10 g Pepton-*Witte*,
10 g KNO_3,
75 g NH_4NO_3,
2 g $MgSO_4$.

Diese Nährsalze werden in je 500 ccm Wasser gelöst und davon je 4 ccm zu den einzelnen Versuchen gegeben. Dies entspricht im Falle I

[1] *Braun* u. *Bleyer*, Zeitschr. f. anal. Chem. **76**, 1, 1929. — [2] *Frey*, Arch. f. Mikrobiol. **2**, 285, 1931.

einer Menge von 0,15 g Gesamtstickstoff auf 100 ccm und im Falle II einer Menge von 0,13 g Gesamtstickstoff.

Weiter setzten wir jedem Versuch noch 0,2 ccm einer Mischlösung zu, die aus $CuSO_4$, $FeSO_4$ und $ZnSO_4$ zusammengesetzt war, wodurch in den Nährlösungen eine Konzentration von 0,000 15 % Cu, 0,0001 % Fe nnd 0,0001 % Zn entsteht.

Die Zugabe des anorganischen Phosphats erfolgte als KH_2PO_4, und zwar in Form einer Lösung von *8 g in 100 ccm Wasser*, so daß 1 ccm dieser Lösung 41,8 mg P_2O_5, der Phosphorgabe I, entspricht. Da das von uns angewandte Phytinpräparat außerdem 8,09 % Ca enthielt, gaben wir in den Versuchen mit anorganischem Phosphat noch jeweils die den Phytinversuchen entsprechende Menge an Ca in Form einer Lösung von 2,047 % $CaCl_2$ hinzu. Je 1 ccm dieser Lösung enthält dann an Calciumionen dieselbe Menge wie 1 ccm der Phytinlösung.

Als Phytinpräparat benutzten wir Cibaphytin mit einem Phosphorgehalt von 20,0 % P bzw. 45,77 % P_2O_5. Einen Gehalt von 2 % anorganischem Phosphor glaubten wir nicht besonders berücksichtigen zu müssen, da höchstens eine geringe graduelle Beeinflussung der Versuchsergebnisse möglich war und die Darstellung eines absolut reinen und einheitlichen Inosithexaesters sehr zeitraubend erschien. Wir lösten 4,568 g Phytin auf 50 ccm unter Zusatz einiger ccm n/10 HCl und setzten die Phytinmenge (1 ccm dieser Lösung: 91,36 mg Phytin bzw. 41,4 mg P_2O_5) nach der Sterilisation der Nährlösung zu, da bei der Sterilisation selbst eine Aufspaltung des Phytins zu erwarten gewesen wäre. Infektionen konnten trotzdem in den Versuchen nicht beobachtet werden.

Anlage der Versuche.

Die Verwendung zweier Grundnährlösungen mit verschiedenem Stickstoffgehalt, I. mit anorganischem Stickstoff und II. mit einer Mischung von organischem und anorganischem Stickstoff, bezweckt zunächst die Lösung der Frage, ob und wie weit der Einfluß des Stickstoffs gegenüber dem Phosphor hervortritt und welche Veränderung die Säurebildung dadurch erleidet. Ebenso sollte durch die Staffelung der P_2O_5-Gaben in beiden Fällen zunächst der Einfluß der Phosphorsäuremengen festgestellt werden bzw. die Frage geklärt werden, ob derselbe in Abhängigkeit vom Stickstoffstoffwechsel und der Bindungsform des Phosphors der Richtung nach gleich bleibt.

Versuchsergebnisse.

1. Grundstoffwechsel.

Um eine einheitliche Vergleichsgrundlage für den qualitativen und quantitativen Stickstoff- und Phosphoreinfluß zu schaffen, wurde die

Nährlösung.
(200 ccm 15 %ige Saccharoselösung + Zusätze der einzelnen Versuchsreihen).

Versuchsreihe Nr.	Stickstoff	Phosphor mg	Ca mg	Restzucker g	Titr. Azidität ccm n NaOH pro 10 ccm	Citronensäure g	p_H	P_2O_5 in Lösung org. mg	P_2O_5 in Lösung anorg. mg	Mycel g	Citronensäureausbeute % abs.	Citronensäureausbeute % rel.	Myceleausbeute % rel.
I 1a	NL. 1	41,8 anorg. P_2O_5	7,39	6,70 | 6,38	0,6 | 0,7	8,76 | 8,59	3,00 | 2,98	—	Spuren	3,24 | 3,45	29,20	37,60	13,90
I 1b		41,8	7,39	6,03	0,8	8,43	2,97	—	„	3,65	28,10	35,19	15,23
I 2a	nur anorg. N	83,6	14,78	5,83 | 5,85	0,72 | 0,72	9,01 | 8,77	2,87 | 2,90	1,0	31,9 | 29,4	3,70 | 3,68	30,03	37,28	15,31
I 2b		83,6	14,78	5,88	0,72	8,54	2,94	1,6	26,8	3,65	28,47	35,41	15,13
I 3a		125,4	22,17	4,55 | 4,64	1,07 | 0,97	9,6 | 9,5	2,87 | 2,94	3,2	52,3 | 56,4	4,17 | 4,04	32,00	37,72	16,38
I 3b		125,4	22,17	4,72	0,89	9,4	3,01	1,8	60,6	3,92	31,33	37,18	15,51
II 4a	NL. 2	41,8 anorg. P_2O_5	7,39	7,20 | 6,60	0,51 | 0,58	9,01 | 8,74	2,58 | 2,70	—	negativ	3,40 | 3,86	30,03	39,52	14,91
II 4b		41,8	7,39	6,00	0,65	8,46	2,91	—	„	4,13	28,20	35,25	17,22
II 5a	org. u. anorg. N	83,6	14,78	5,73 | 5,50	0,54 | 0,55	7,43 | 7,43	2,86 | 2,79	11,2	16,8 | 16,7	3,85 | 4,0	24,77	30,61	15,86
II 5b		83,6	14,78	5,30	0,55	7,42	2,71	17,8	16,6	4,17	24,73	30,04	16,88
II 6a		125,4	22,17	5,95 | 5,20	0,69 | 0,71	7,63 | 7,62	2,84 | 2,82	15,3	68,9 | 65,7	3,92 | 4,19	25,43	31,73	16,30
II 6b		125,4	22,17	5,45	0,72	7,61	2,81	10,3	62,5	4,30	25,37	29,78	16,83
III 7a	NL. 1	41,4 Phytin P		5,47 | 5,52	1,21 | 1,22	8,20 | 8,06	3,08 | 3,06	negativ	negativ	4,45 | 4,77	27,33	33,43	18,14
III 7b		41,4		5,57	1,24	7,93	3,04	„	„	5,10	26,43	32,46	20,88
III 8a		82,8		4,10 | 4,40	1,15 | 1,27	8,46 | 8,97	2,69 | 2,67	4,3	15,9 | 14,6	4,85 | 5,17	28,20	32,66	18,73
III 8b		82,8		4,70	1,42	9,43	2,63	4,1	13,4	5,50	31,43	37,27	21,74
III 9a		124,2		3,87 | 3,93	1,30 | 1,30	9,01 | 9,11	2,83 | 2,80	10,0	56,8 | 51,4	6,38 | 5,02	30,03	34,48	20,59
III 9b		124,2		4,00	1,30	9,22	2,78	9,6	45,9	4,69	30,73	35,46	18,04
IV 10a	NL. 2	41,4 Phytin P_2O_5		4,68 | 4,27	1,33 | 1,53	7,31 | 7,48	2,80 | 2,77	negativ	negativ	4,72 | 4,97	24,47	28,87	18,64
IV 10b		41,4		3,87	1,73	7,64	2,75	„	„	5,22	25,47	29,24	19,98
IV 11a		82,8		4,03 | 4,01	0,80 | 0,90	6,54 | 6,43	2,58 | 2,54	6,3	19,8 | 19,3	5,13 | 5,20	21,80	25,18	19,75
IV 11b		82,8		4,00	1,00	6,32	2,51	5,8	19,1	5,27	21,07	24,31	20,27
IV 12a		124,2		3,52 | 3,33	1,22 | 1,15	6,76 | 5,38	2,63 | 2,54	8,4	39,6 | 40,8	5,16 | 5,45	22,53	25,53	19,49
IV 12b		124,2		3,13	1,08	5,84	2,46	8,9	42,1	5,70	19,47	21,73	21,21

Versuchsreihe I mit verschiedenen Phosphorgaben durchgeführt. Es zeigte sich hier, daß zwar mit zunehmenden überschüssigen Phosphorgaben noch eine erhöhte Phosphoraufnahme stattfindet und damit verbunden eine Erhöhung des Mycelgewichts und Abnahme des Restzuckers zu beobachten ist, daß jedoch eine wesentliche Veränderung der Säurebildung nicht damit verknüpft ist. Man kann daraus schließen, daß die Phosphormenge in Form von anorganischem Phosphat, soweit sie das physiologisch notwendige Minimum überschreitet, keinen erheblichen Einfluß auf die Gärungsvorgänge ausübt. Diese Feststellung bezieht sich auf solche Fälle, in denen in Anwesenheit von anorganischem Stickstoff unaufgenommener Restphosphor in den Nährlösungen nachzuweisen ist.

2. Der Einfluß von organischem Stickstoff in Gegenwart von anorganischem Phosphor.

Wir ersetzten in diesem Versuch von einem Gesamtstickstoff pro Versuch in Höhe von 0,259 g Stickstoff einen Teil (0,0254 g = 9,8 %) durch Aminostickstoff (Asparagin) und einen Teil durch Peptonstickstoff (0,0130 g = 5,0 %), so daß das Verhältnis anorganischer Stickstoff : organischem Stickstoff = 5,6 : 1 war. Bereits diese verhältnismäßig geringe Veränderung der angewandten Stickstofform hat erhebliche Verschiebungen im Entwicklungsverlauf von Aspergillus niger zur Folge. Zunächst wird die Aufnahme von Phosphor erheblich gesteigert, bleibt jedoch dann bei einem Maximum von aufgenommenem Phosphor stehen und sinkt sogar bei weiterer Erhöhung wieder zurück. Die interessante Tatsache jedoch, daß wir in diesen Fällen bei Zusatz von anorganischem Phosphat Mengen bis zu 10 mg P_2O_5 in Form von organisch gebundenem Phosphor wiedergefunden haben, läßt darauf schließen, daß nach der Endphosphorbilanz nicht nur Phosphoraufnahme, sondern auch eine Phosphorabgabe durch das Mycel in die Lösung stattgefunden haben muß.

Neben dieser Beeinflussung des Phosphorstoffwechsels hat die Mitverwendung von organischem Stickstoff eine deutliche Verminderung der Säurebildung und Erhöhung des Mycelgewichts im Gefolge gehabt.

Da für unsere Fragestellung von besonderer Wichtigkeit ist, in welchem quantitativen Verhältnis Atmung und Gärung, erfaßt durch Mycelgewicht und Säurebildung, in Abhängigkeit von organischem N und organischem Phosphor (Phytinphosphor) sich verändern, ist in den folgenden Tabellen kurz die prozentuale Veränderung dieser Faktoren in Abhängigkeit von einem teilweisen Ersatz von anorganischem Stickstoff durch organischen zusammengefaßt:

	Veränderung des Mycelgewichts in %	Veränderung der Säurebildung* in %
Phosphormenge 1: 41,8 mg . . .	+ 11,9	+ 0,46
„ 2: 83,6 „ . . .	+ 8,7	— 4,47
„ 3: 125,4 „ . . .	+ 3,7	— 6,26

* Erfaßt durch den Durchschnittswert der absoluten Citronensäureausbeute in den Parallelversuchen a und b. Grundwerte: die Zahlen der Versuchsreihe I.

Es zeigt sich daraus sehr deutlich, daß der Einfluß von organischem Stickstoff graduell sehr verschieden ist, insofern als bei der geringsten Phosphorgabe die Mycelgewichtssteigerung durch organischen Stickstoff am größten ist, während bei der höchsten Phosphorgabe die Steigerung des Mycelgewichts, das ja an sich bereits durch die Phosphorgabe erhöht ist, gegenüber der starken Verminderung des Säuregrades zurücktritt. Man kann deshalb bereits aus diesen Versuchsergebnissen den Schluß ziehen, daß ein getrennter, einseitig vorherrschender Einfluß von Stickstoff auf das Mycelgewicht bzw. von Phosphor auf die Säurebildung wohl kaum anzunehmen ist, sondern daß der Einfluß dieser beiden Nährstoffe nach Menge und Form wechselseitig voneinander abhängig ist.

3. Der Einfluß von Phytinphosphor auf Wachstum und Säurebildung bei Aspergillus niger.

Welch entscheidenden Einfluß nun die Änderung der Phosphorbindungsform ausübt, zeigt bereits die Versuchsreihe III.

	Veränderung des Mycelgewichts in %	Veränderung der Säurebildung in %
Phosphormenge 1: 41,4 mg . . .	+ 35,4	— 1,77
„ 2: 82,8 „ . . .	+ 40,5	+ 0,58
„ 3: 124,2 „ . . .	+ 24,3	— 1,28

Bei einer geringen Schwankung der Säurebildung wird das Mycelgewicht in allen Fällen außerordentlich stark erhöht unter gleichzeitiger Verringerung der Restzuckermenge, so daß ein außerordentlich enger Zusammenhang zwischen Mycelwachstumsverlauf und der Phosphoraufnahme bei Aspergillus erkennbar wird. Dabei wird die Säurebildung durch die Mycelgewichtssteigerung in diesem Falle allein noch nicht wesentlich vermindert, was erst der Fall ist, wenn gleichzeitig mit der Phytinphosphorgabe noch ein Teil des Stickstoffs in Form von organischem Stickstoff vorgelegt wird und dabei sich das Mycelgewicht noch mehr erhöht (Versuchsreihe IV).

	Veränderung des Mycelgewichts in %	Veränderung der Säurebildung in %
Phosphormenge 1	44,1	— 4,16
„ 2	41,3	— 7,82
„ 3	34,4	— 11,66

Die Verringerung der Säurebildung ist also in ganz besonderem Maße abhängig von der Stickstofform in dem Sinne, daß bereits ein teilweiser Ersatz von anorganischem Stickstoff durch organischen zu einer Verminderung der Citronensäureausbeute führt. Der Grad der Abhängigkeit geht mit der Menge der Phosphorgabe parallel. Wir ziehen daraus den Schluß, daß die Citronensäurebildung zunächst in engster Abhängigkeit vom Stickstoffstoffwechsel verläuft und daß ein Einfluß der Phosphormenge und Phosphorbindungsform nur sekundär insofern möglich ist, als damit ebenfalls eine Beeinflussung der Stickstoffaufnahme und des Mycelwachstumsverlaufs möglich ist. Aus dieser Verknüpfung der Abhängigkeit geht indirekt hervor, daß die Verbindung zwischen Atmung und Gärung bei Aspergillus niger inniger ist als bei Hefen.

Bemerkenswert dabei ist, daß die Phosphoraufnahme auf Grund der Endbilanz verhältnismäßig geringe Schwankungen zeigt.

Sie betrug nach folgender Zusammenstellung:

	Phosphorsäureaufnahme	
	bei Anwesenheit von anorganischem Stickstoff	bei Anwesenheit von organischem und anorganischem Stickstoff
a) Organischer Phosphor:		
Menge 2	64,0 mg P_2O_5	57,5 mg P_2O_5
„ 3	63,0 „ P_2O_5	74,8 „ P_2O_5
b) Anorganischer Phosphor:		
Menge 2	52,9 mg P_2O_5	52,4 mg P_2O_5
„ 3	66,7 „ P_2O_5	46,9 „ P_2O_5

Der Phytinphosphor ist, wie aus dem erhöhten Phosphorverbrauch in drei Fällen hervorgeht, leichter vom Mycel aufnehmbar und es besteht deshalb kein Zweifel, daß trotz der teilweisen Aufspaltung des überschüssigen Phosphors der Phytinphosphor als solcher aufgenommen wird. Die teilweise Überführung von Phosphor in organische Bindung ist ein indirekter Beweis für die leichte Resorbierbarkeit organisch gebundenen Phosphors.

Welche Rolle der Phytinphosphor bei der festgestellten engen Beziehung zum reinen Mycelaufbau spielt, bleibt zunächst noch ungeklärt; es wäre daran zu denken, daß diese spezielle Bindungsform ihn

für den Aufbau von Nucleoproteiden, also von Stoffen, welche bei einer intensiven Zellenvermehrung notwendig sind, besonders geeignet macht, was um so wahrscheinlicher ist, als in unseren Versuchen bei Zusatz von organischem Phosphor auch die Differenzierung der Menge desselben einen stärkeren Einfluß ausübt, als bei der Verwendung von rein anorganischem Phosphor.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit bestände in der leichteren Permeabilität dieser Phosphorform, eine Eigenschaft, welche nach *Boas* durchaus nicht allein von der Molekülgröße abhängt.

Daß die Säurebildung unter den für das reine Wachstum und die Vermehrung der Zellen günstigen Bedingungen dann stark absinkt, und zwar weitaus am stärksten bei der Verwendung von organischem Stickstoff und Phosphor, weniger bei Verwendung von organischem Stickstoff und anorganischem Phosphor, ist ohne weiteres klar, da die leichte Aufnehmbarkeit dieser Nährstoffe dem energiereicheren Atmungsstoffwechsel die notwendige Nährstoffgrundlage gibt.

4. Phosphorverbrauch bei gleichzeitiger Anwesenheit von anorganischem Phosphor und Phytinphosphor.

Infolge der in den Versuchsreihen III und IV festgestellten Spaltung von Phytinphosphor war es auf Grund der von uns durchgeführten analytischen Methodik unmöglich, ein klares Bild über die bevorzugte Assimilation von organischem gegenüber anorganischem Phosphor zu geben, die an sich auf Grund der Ergebnisse der Versuchsreihen III und IV zu erwarten gewesen wäre. Wir haben diese Versuche zwar bereits angesetzt und durchgeführt, auf ihre Wiedergabe wird jedoch verzichtet. Wir behalten uns vor, diese Versuche mittels einer Methodik durchzuführen, die uns gestattet, die drei verschiedenen Phosphate, anorganisches Phosphat, organischen Phytinphosphor und aus Phytinphosphor abgespaltene Phosphorsäure, nebeneinander zu bestimmen.

Zusammenfassung.

1. Zunehmender Phosphorgehalt der Nährlösung bewirkt ohne Unterschied der Bindungsform Zunahme des Mycelgewichts und Zunahme des Zuckerverbrauchs. Die Säurebildung ist weniger abhängig von der Menge der P_2O_5-Gabe (innerhalb der von uns gegebenen Mengen), da bereits die kleinste angewandte P_2O_5-Menge, welche vollständig aufgebraucht wird, das Optimum für die Säurebildung darstellt. Besteht die Stickstoffgabe zum Teil aus organischen Stickstoffsalzen, so nimmt die Säurebildung mit zunehmender Phytinphosphorgabe ab.

Die Veränderungen der Endwerte des p_H und der Titrationsazidität sind gering und geben keinen Einblick in die Vorgänge der Säurebildung.

2. Der Zuckerverbrauch und das Mycelgewicht werden in hohem Maße durch die Art der P_2O_5-Gabe beeinflußt, stärker als durch die Art der Stickstoffgabe. Die Form der Stickstoffgabe beeinflußt besonders die Säurebildung. Soweit das Phytin nicht von den Zellen aufgenommen wird, wird es zum größten Teil von der in die Lösung abgegebenen Phytase aufgespalten. Der Phosphorverbrauch ist bei Zufuhr von Phytinphosphor, unabhängig von der Stickstoffgabe, in allen Fällen höher als bei der Zugabe von anorganischem Phosphat.

Über den Abbau der Buttersäure durch überlebende Leberschnitte.

Von

Enrico Ciaranfi.

(Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie der K. Universität Florenz.)

(Eingegangen am 17. Februar 1936.)

Während im Kohlenhydratstoffwechsel die Kenntnis der quantitativen Beziehungen zwischen seinen verschiedenen Stufen zu wichtigen Fortschritten geführt hat, fehlen im Fettstoffwechsel sichere Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen, die zwischen dem Sauerstoffverbrauch und dem Abbau der Fettsäuren bestehen. Die für die Erforschung des Fettstoffwechsels vorwiegend angewandte Methode der Durchblutung überlebender Organe gestattet im Gegensatz zur Untersuchung überlebender Gewebeschnitte nach der Methode von *O. Warburg* keine quantitative Prüfung dieser Frage. Die Vorzüge der *Warburg*schen Methode für Untersuchungen über den Fettstoffwechsel ergeben sich aus den Arbeiten von *Wigglesworth*, *Quastel* und *Wheatley*, *Mazza*, *Stolfi* und *Zummo*, *Califano*, *Edson*, *Jowett* und *Quastel*, die gezeigt haben, daß Gewebeschnitte imstande sind, die Fettsäuren unter Bildung von Ketonkörpern zu oxydieren und auch diese letzteren völlig abzubauen.

Keine dieser Arbeiten beschäftigt sich indessen in besonderer Weise damit, ein quantitatives Verhältnis zwischen der Atmung des Gewebes und der Menge der gebildeten Abbauprodukte festzustellen, und ich habe es daher unternommen, dieser für die Kenntnis des Fettsäureabbaues unter normalen und pathologischen Bedingungen wichtigen Frage nachzugehen. Meine Versuche beziehen sich vorläufig nur auf die Umsetzung der Buttersäure und ihrer Abbauprodukte in der Leber, wobei besonders die folgenden Fragen untersucht wurden:

1. Vergleich der Atmung mit der Summe der in dem Gewebe gebildeten β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure.
2. Messung der Atmung der Leber in Gegenwart von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure; Oxydation der β-Oxybuttersäure zu Acetessigsäure und Reduktion der letzteren zu β-Oxybuttersäure.
3. Messung des Respirationsquotienten der Leber in Gegenwart von Buttersäure.

Methode.

Die Atmungsgefäße nach *Warburg* enthalten je einen Schnitt von Meerschweinchenleber (Trockengewicht 5 mg) in 5 ccm Flüssigkeit; $t = 37{,}5^0$, O_2-Atmosphäre; im Anhang 5 %ige NaOH. In einer ersten Versuchsserie habe ich eine $2{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol. Lösung von Na-Butyrat, gelöst in Ringerlösung ohne Glucose, in einer anderen dieselbe Menge von Na-Butyrat in Ringer ohne Glucose und ohne $NaHCO_3$ angewandt, mit $6{,}6 \cdot 10^{-3}$ mol. Phosphat vom p_H 7,2 als Puffer. Die Beobachtung verschiedener Autoren, daß die Gegenwart von Phosphaten die Verbrennung der Fettsäuren begünstigt, kann ich vollkommen bestätigen. Als Kontrolle dienten dieselben Salzlösungen ohne Buttersäure.

Nach 1 Stunde wurde die Butyrat enthaltende Flüssigkeit aus den Gefäßen entfernt, die Schnitte gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und das Waschwasser zur Flüssigkeit hinzugefügt. In einer Hälfte der Flüssigkeit wurde die Acetessigsäure bestimmt, in der anderen die β-Oxybuttersäure. Die Bestimmung der Ketonkörper erfolgte nach der gravimetrischen Methode von *van Slyke*, die ich jedoch teilweise für meine Zwecke abändern mußte. Ich habe nämlich beobachtet, daß die Fällung in dem enteiweißten Filtrat der Gewebe zu großen Fehlern führt, wenn man nicht die Kohlenhydrate mittels Kalkmilch und Kupfersulfat entfernt. Deshalb habe ich es vorgezogen, die Acetessigsäure zusammen mit dem Aceton nach der Destillation aus der sauren Lösung zu bestimmen. Für die β-Oxybuttersäure habe ich die direkte Bestimmung nach *van Slyke* angewandt, nach Fällung des Eiweißes und Entfernung der Kohlenhydrate. Es wurden Kontrollversuche mit bekannten Mengen von Ketonkörpern in reiner Lösung und in Leberextrakt ausgeführt. Die Ergebnisse waren zufriedenstellend, wenn man für die β-Oxybuttersäure den Faktor 8,45 und für die Acetessigsäure den Faktor 8,5 (empirisch bestimmt) benutzte. Unter diesen Bedingungen weichen die Untersuchungsergebnisse nicht mehr als 5 % von den theoretischen Werten ab.

Die β-Oxybuttersäure wird teilweise von den Schnitten adsorbiert (in unseren Versuchen bis zu 5 %); dies haben schon *Snapper* und *Grünbaum* an ganzen Organen beobachtet. Die Acetessigsäure wird dagegen nicht merklich adsorbiert. Um die beiden Säuren getrennt zu bestimmen, verfuhr ich wie folgt:

Acetessigsäure. Enteiweißung nach *Folin-Wu*; der Niederschlag wird durch Zentrifugieren entfernt, danach mit etwas destilliertem Wasser, welches einige Tropfen Reagens enthält, aufgeschwemmt und von neuem zentrifugiert. Die Flüssigkeiten (ungefähr 30 ccm) werden vereinigt und in einen *Kjeldahl*-Kolben von 100 ccm mit geschliffenem Hals gefüllt, mit H_2SO_4 angesäuert (2 ccm H_2SO_4 50 Vol.-% auf 30 ccm Flüssigkeit) und 10 Minuten lang durch einen gewöhnlichen geschliffenen Mikro-*Kjeldahl* in einige ccm destilliertes Wasser hineindestilliert. Zu dem Destillat, welches auf 30 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt worden ist, fügt man eine entsprechende Menge der Reagenzien von *van Slyke* hinzu und erhitzt 30 Minuten lang in einem *Kjeldahl*-Kolben von ungefähr 100 ccm mit angeschliffenem Rückflußkühler. Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt, bei 110° getrocknet und auf der Mikrowaage gewogen.

β-Oxybuttersäure. Enteiweißung mit $HgSO_4$-Lösung nach *van Slyke*, Entfernung des Niederschlags durch Zentrifugieren, Fällung des Quecksilbers mit H_2S, Filtrieren, Entfernung des H_2S durch Luftstrom, Fällung der

Kohlenhydrate mit Kalkmilch und Kupfersulfat, Abzentrifugieren des Niederschlags. Da beim quantitativen Waschen der Niederschläge die Gesamtmenge der Flüssigkeit bedeutend zunimmt, und da die Bestimmung kleiner Mengen von β-Oxybuttersäure in einer großen Flüssigkeitsmenge nicht unbedeutende Fehler zur Folge hat, säuert man die Flüssigkeit mit H_2SO_4 bis zur sauren Reaktion (Lackmus) an und konzentriert im Vakuum im Wasserbad bei 40° bis auf ungefähr 10 bis 15 ccm. Man filtriert von dem während des Eindampfens ausgefallenen $CaSO_4$ ab, wäscht das Filter quantitativ aus, füllt auf 30 ccm mit destilliertem Wasser auf, fügt eine entsprechende Menge Quecksilbersulfat und Schwefelsäure hinzu und erhitzt eine halbe Stunde in einem *Kjeldahl*-Kolben von ungefähr 100 ccm mit angeschliffenem Rückflußkühler. Dann filtriert man, fügt zu dem Filtrat die nötige Menge Bichromatlösung hinzu und läßt noch $1^1/_2$ Stunden kochen. Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt, bei 110° getrocknet und auf der Mikrowaage gewogen.

Es sei darauf hingewiesen, daß auch die Krotonsäure teilweise durch das Kochen in der verdünnten Chromschwefelsäuremischung zu Acetessigsäure und Aceton oxydiert wird und daher einen Niederschlag mit *Denigès* Reagens gibt.

Wenn man die Menge der Acetessigsäure und diejenige der β-Oxybuttersäure, die von den Leberschnitten während einer Stunde gebildet werden, kennt, kann man die Sauerstoffmenge berechnen, welche für die β-Oxydation der Buttersäure benötigt wird.

Vor meinen Bilanzproben stellte ich fest, ob in Abwesenheit von Buttersäure spontan Ketonkörper in den Leberschnitten gebildet werden. Die Versuche bewiesen, daß keine β-Oxybuttersäure und nur Spuren von Acetessigsäure gebildet werden.

Die Bilanzversuche sind sowohl in Bicarbonatringer als auch in Phosphatringer gemacht worden. Die Resultate sind in den Tabellen I und II enthalten. In Tabelle III werden die Mittelwerte der beiden Versuche verglichen.

Tabelle I. Meerschweinchenleber.

Temperatur 37,5°; O_2; Versuchsdauer 1 Stunde, $2{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol. Lösung von Na-Butyrat in Bicarbonatringer. Kontrolle Bicarbonatringer. Hauptraum 5 ccm Flüssigkeit. Birne 0,4 ccm NaOH (5%). 8 Manometer.

Nr.	Q_{O_2}	$Q_{O_2}^{Butyrat}$	Δ_{O_2}	mg Acetessigsäure / mg Gewebe	mg β-Oxybuttersäure / mg Gewebe	Prozentualer Teil von Δ_{O_2} gebraucht zur Bildung von: Acetessigsäure	β-Oxybuttersäure	Gesamtsumme der Ketonkörper
1	5,5	6,6	1,1	$2 \cdot 10^{-3}$	$2{,}9 \cdot 10^{-3}$	42	30	72
2	6,3	7,7	1,4	2,4	2,1	37	16	53
3	5,6	6,8	1,2	2,8	2,4	51	19	70
4	6	7,9	1,9	2,9	2,7	33	15	48
5	5,4	6,3	0,9	1,1	2	27	24	51

Tabelle II. Meerschweinchenleber.

$2{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol. Lösung von Na-Butyrat in Phosphatringer. Kontrolle Phosphatringer. Alles übrige wie in Tabelle I.

Nr.	Q_{O_2}	$Q_{O_2}^{Butyrat}$	Δ_{O_2}	mg Acetessigsäure / mg Gewebe	mg β-Oxybuttersäure / mg Gewebe	Prozentualer Teil von Δ_{O_2} gebraucht zur Bildung von: Acetessigsäure	β-Oxybuttersäure	Gesamtsumme der Ketonkörper
1	5,4	7,1	1,7	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$	$6{,}1 \cdot 10^{-3}$	20	39	59
2	5,8	8,6	2,8	1,2	9,5	9	36	45
3	5,7	8	2,3	0,9	6,2	8	29	37
4	5,3	8	2,7	1,8	5,8	7	23	30
5	5	7,1	2,1	0,3	5,7	3	26	29

Tabelle III. Mittelwert der Atmung und der Ketonkörperbildung in Bicarbonatringer und in Phosphatringer.

	Δ_{O_2}	mg Acetessigsäure / mg Gewebe	mg β-Oxybuttersäure / mg Gewebe	Prozentualer Teil von Δ_{O_2} gebraucht zur Bildung von: Acetessigsäure	β-Oxybuttersäure	Gesamtsumme der Ketonkörper
Bicarbonatringer	1,3	$2{,}2 \cdot 10^{-3}$	$2{,}4 \cdot 10^{-3}$	38	20	58
Phosphatringer	2,3	1,1	6,6	10	30	40

Die Ergebnisse zeigen, daß die Oxydation der Buttersäure in verschiedener Weise vor sich geht, je nachdem die Ringerlösung mit Bicarbonat oder mit Phosphat gepuffert ist. In Gegenwart von Phosphat ist die Oxydation der Buttersäure und auch die Gesamtbildung der Ketonkörper größer. Man beobachtet jedoch, daß in Bicarbonatringer die vom Gewebe gebildete Menge β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure ungefähr gleich ist, während in Phosphatringer die reduzierte Form stark überwiegt.

In den Versuchen mit Bicarbonatringer beträgt die Sauerstoffmenge, die der β-Oxydation entspricht, nur 50 bis 70 %, in Phosphatringer nur 30 bis 60 % der tatsächlich absorbierten Menge. Dies zeigt, daß neben der Bildung der Ketonkörper noch andere Oxydationsvorgänge in den Schnitten vor sich gehen. Möglicherweise findet eine weitere Oxydation der Ketonkörper statt. Ich habe untersucht, ob die Oxydation unter meinen Versuchsbedingungen erfolgt.

Schon im Jahre 1906 beobachteten *Embden*, *Salomon* und *Schmidt*, daß in einer Leber, welche man mit Blut durchblutet, dem man β-Oxybuttersäure hinzugefügt hat, sich bedeutende Mengen Acetessigsäure bilden. *Wakeman* und *Dakin* beobachteten, daß die Oxydation der β-Oxybuttersäure auch in Leberbrei erfolgt. *Embden* und *Michaud*, welche den weiteren Abbau der Acetessigsäure durch die Leber studierten, stellten fest, daß ein

Teil der letzteren während der Durchblutung verschwindet, ohne daß sich eine entsprechende Menge Aceton bildet, so daß diese Autoren an eine Hydrolyse der Säure dachten, ohne jedoch eine vermehrte Bildung von Essigsäure nachweisen zu können. In Wirklichkeit findet man die verschwundene Acetessigsäure in Form von β-Oxybuttersäure wieder, denn die Leber enthält, was von *Wakeman* und *Dakin* bewiesen worden ist, neben den Enzymen, welche imstande sind, β-Oxybuttersäure zu Acetessigsäure zu oxydieren, auch Enzyme, welche imstande sind, die letztere zu β-Oxybuttersäure zu reduzieren. Nach diesen Autoren wäre sogar die reduzierende Wirkung vorwiegend. *Wiggleswortb* beobachtete, daß die Gegenwart von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure den Sauerstoffverbrauch von Schnitten von Rattenleber vergrößert, und schloß daraus, daß diese beiden Stoffe von der Leber oxydiert werden, ohne jedoch die Oxydationsprodukte zu untersuchen. Im Gegensatz dazu beobachtete *Stöhr*, daß Acetessigsäure atmungshemmend wirkt. *Snapper* und *Grünbaum* haben bewiesen, daß die β-Oxybuttersäure, welche man dem Blut im Durchströmungsversuch zufügt, sich am Schluß des Versuchs vollständig wiederfindet, teils als solche und teils in Form von Acetessigsäure; Acetessigsäure wird nach den gleichen Autoren in Form von β-Oxybuttersäure wiedergefunden. *Kühnau* isolierte aus der Leber ein Enzym, welches die β-Oxybuttersäure sowohl aerob als auch anaerob abbaute; die Acetessigsäure wäre nach seiner Annahme aus der β-Oxybuttersäure nicht durch direkte Oxydation entstanden, sondern durch einen Dismutationsprozeß unter Bildung eines Moleküls β-Oxybuttersäurealdehyd. Andere Produkte sind Aldol, 1, 3-Butylenglykol, Acetaldehyd, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Spuren von Essigsäure und Brenztraubensäure. *Kühnau* beobachtete auch die Bildung von Dicarbonsäuren aus der Acetessigsäure durch Leberextrakt.

Kürzlich beobachteten *Jowett* und *Quastel*, daß Leberschnitte die β-Oxybuttersäure zu Acetessigsäure oxydieren und daß die letztere in Gegenwart von Sauerstoff teilweise zerstört wird.

Ich habe versucht festzustellen, ob die Acetessigsäure und die β-Oxybuttersäure in den in meinen Versuchen in Frage kommenden Konzentrationen Einfluß auf die Oxydationsprozesse in der Leber haben.

Auch diese Versuche wurden sowohl in Bicarbonatringer als auch in Phosphatringer durchgeführt. In den Respirationsversuchen mit β-Oxy-

Tabelle IV. Meerschweinchenleber.

Temperatur 37,5°; O_2; 1 Stunde Versuchsdauer, 10^{-3} mol. β-Oxybuttersäure. Hauptraum 5 ccm. Birne 0,4 ccm 5% NaOH.

Q_{O_2}	$Q^{\beta}_{O_2}$-Oxybuttersäure	Δ_{O_2}	$\frac{\text{mg Acetessigsäure}}{\text{mg Gewebe}}$	
4	4	0	$1 \cdot 10^{-3}$	Bicarbonatringer
4,4	4,7	0,3	0,9	
5,3	5,3	0	0,9	
4	4	0	Unbestimmbare Spuren	Phosphatringer
5	5,2	0,2	$1 \cdot 10^{-3}$	
4,6	4,6	0,2	1	

Tabelle V. Meerschweinchenleber.

Temperatur 37,5°; O_2; 1 Stunde Versuchsdauer; 10^{-3} mol. Acetessigsäure. Hauptraum 5 ccm. Birne 0,4 ccm 5% NaOH.

Q_{O_2}	$Q_{O_2}^{\text{Acetessigsäure}}$	Δ_{O_2}	mg β-Oxybuttersäure / mg Gewebe	
6,4	6,8	0,4	$2,7 \cdot 10^{-3}$	Bicarbonatringer
5,2	5,8	0,6	0,9	
5,6	6,3	0,7	0,7	
4,4	4,7	0,3	3	Phosphatringer
6,2	6,9	0,7	0,5	
5,3	5,8	0,5	Spuren	

buttersäure wurde die Bildung von Acetessigsäure untersucht, in denjenigen mit Acetessigsäure die Bildung von β-Oxybuttersäure. Es wurde eine racemische β-Oxybuttersäure verwendet (*Kahlbaum*) und eine Acetessigsäure, die durch Verseifung von Acetessigsäureäthylester nach den Vorschriften von *Ljunggren* gewonnen wurde. Beide Säuren wurden in Form von Natriumsalzen verwendet.

Die Tabellen IV und V zeigen, daß bei der von mir angewandten Konzentration die β-Oxybuttersäure von der Leber in ganz geringem Grade, manchmal nicht einmal manometrisch nachweisbar, oxydiert wird; die kleinen Werte für Δ_{O_2} liegen innerhalb der Fehlergrenze. Man beobachtet jedoch immer die Bildung kleiner Acetessigsäuremengen. Dagegen wird die Acetessigsäure bei der gleichen molaren Konzentration sicher von der Leber oxydiert: die Werte für Δ_{O_2} sind klein aber konstant. Die chemische Analyse zeigt, daß ein Teil der Acetessigsäure von den Schnitten zu β-Oxybuttersäure reduziert wird.

In allen diesen Versuchen sind die Mengen β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure, die aus der Acetessigsäure durch Reduktion bzw. aus der β-Oxybuttersäure durch Oxydation gebildet werden, kleiner als diejenigen, die sich in meinen Versuchen mit Butyrat finden. Es bestehen keine Unterschiede bei Verwendung der beiden verschiedenartig gepufferten Ringerlösungen. Um diese Tatsache zu erklären, die mir für die Bildungsweise der Ketonkörper wichtig scheint, habe ich untersucht, wie sich die Bildung dieser Substanzen unter gleichen Versuchsbedingungen in äquimolekularen Lösungen von Buttersäure, β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure verhält.

Die Versuche wurden wie gewöhnlich in Bicarbonatringer und in Phosphatringer angestellt, wobei eine doppelt so hohe Konzentration von Fettsäure angewandt wurde wie in den vorhergehenden Versuchen. Auf die Messung der Gewebeatmung wurde verzichtet. Die Schnitte, fünf in jedem Versuch, wurden in einem *Erlenmeyer*-Kolben, der 25 ccm Flüssigkeit enthält, bei 37,5° 1 Stunde lang geschüttelt.

Tabelle VI.

$2 \cdot 10^{-3}$ Buttersäure		$2 \cdot 10^{-3}$ β-Oxybuttersäure	$2 \cdot 10^{-3}$ Acetessigsäure
$\frac{\text{mg β-Oxybuttersäure}}{\text{mg Gewebe}} \cdot 100$	$\frac{\text{mg Acetessigsäure}}{\text{mg Gewebe}} \cdot 100$	$\frac{\text{mg Acetessigsäure}}{\text{mg Gewebe}} \cdot 100$	$\frac{\text{mg β-Oxybuttersäure}}{\text{mg Gewebe}} \cdot 100$
In Bicarbonatringer.			
0,03	0,09	0,07	0,07
In Phosphatringer.			
0,13	0,21	0,05	0,22

Dieser Versuch zeigt neuerdings, daß die Gesamtmenge der Ketonkörper, die aus dem Gewebe durch Oxydation der Buttersäure gebildet werden, in Phosphatringer größer ist als in Bicarbonatringer. In Bicarbonatringer verläuft die Reaktion: β-Oxybuttersäure $\rightleftarrows$ Acetessigsäure in beiden Richtungen mit gleicher Geschwindigkeit, während in Phosphatringer die Reaktion von rechts nach links überwiegt. Diese Beobachtung scheint die Erklärung dafür zu geben, warum in dem Oxydationsversuch der Buttersäure das Verhältnis $\frac{\text{β-Oxybuttersäure}}{\text{Acetessigsäure}}$ in Phosphatringer größer ist als in Bicarbonatringer. Nach den bisherigen Befunden scheint die Bildung der Acetessigsäure nicht in der Weise vor sich zu gehen, daß sich erst β-Oxybuttersäure bildet und letztere durch direkte Oxydation, d. h. durch Verbrauch eines weiteren Atoms freien Sauerstoffs in Acetessigsäure verwandelt wird. Es bleiben also drei theoretische Möglichkeiten:

1. Die Verwandlung der β-Oxybuttersäure in Acetessigsäure könnte eine Oxydoreduktion ohne Verbrauch von freiem Sauerstoff sein.

2. Die Buttersäure wird zu Acetessigsäure oxydiert und ein Teil dieser letzteren wird zu β-Oxybuttersäure reduziert.

3. Die Buttersäure wird dehydriert zu Krotonsäure, und diese wird teils unter Bildung von Acetessigsäure oxydiert, teils hydratisiert unter Bildung von β-Oxybuttersäure:

$$\begin{array}{l} CH_3 . CH_2 . CH_2 . COOH \\ \xrightarrow{-2H} CH_3 . CH : CH . COOH \end{array} \begin{array}{l} \xrightarrow{+O} CH_3 . CO . CH_2 . COOH \\ \xrightarrow{+H_2O} CH_3 . CHOH . CH_2 . COOH \end{array}$$

Die erste Möglichkeit, die sich auf die Versuche mit Enzymen von *Kühnau* stützt, wird durch die Versuche von *Wigglesworth*, *Jowett* und *Quastel* mit Leberschnitten ausgeschaltet. Meine Versuche, die mit sehr geringen Konzentrationen von β-Oxybuttersäure angestellt sind, haben in dieser Hinsicht keinen entscheidenden Wert. Die zweite Möglichkeit, die auf Grund meiner Versuche in Phosphatringer denkbar wäre, scheint wenig wahrscheinlich in Bicarbonatringer. Es bleibt somit für die dritte Formu-

lierung die größte Wahrscheinlichkeit. So hat *Mazza*, der die Wirkung von Leberschnitten auf einige phenylaliphatische Säuren studiert hat, beweisen können, daß die γ-Phenylbuttersäure zu $\Delta_{\alpha,\beta}$-γ-Phenylkrotonsäure dehydriert wird, welche dann in Phenyl-β-Oxybuttersäure verwandelt wird. Die Beobachtung, daß die Gegenwart von Krotonsäure den Sauerstoffverbrauch der Gewebeschnitte bedeutend erhöht, wobei allerdings etwas weniger Acetessigsäure gebildet wird als von der Buttersäure, läßt an die Möglichkeit denken, daß die Umwandlung der Krotonsäure in β-Oxybuttersäure nicht allein durch Wasseraufnahme ohne Sauerstoffverbrauch stattfindet, sondern auch durch eine anfängliche Oxydation zu Acetessigsäure und darauffolgende Reduktion zu β-Oxybuttersäure.

Aus den Versuchen über die Oxydation der Acetessigsäure ergibt sich die Notwendigkeit, die Berechnung des Verhältnisses zwischen Produktion der Ketonkörper und Atmung in Tabelle III zu ändern. So müssen die Werte von Δ_{O_2} in den Bilanzversuchen mit Butyrat um den Wert von $\Delta_{O_2}^{\text{Acetess.}}$ verringert werden, d. h. um einen Teil von Δ_{O_2}, der der weiteren Oxydation der Acetessigsäure entspricht. Wenn man die Werte von Tabelle III nach diesen Gesichtspunkten umrechnet, wobei $\Delta_{O_2}^{\text{Butyrat}}$ dem Gesamt-Δ_{O_2} entspricht, dem der Wert $\Delta_{O_2}^{\text{Acetess.}}$ abgezogen worden ist, den man zu ungefähr 0,5 cmm rechnen kann, beobachtet man, daß in Bicarbonatringer der zur β-Oxydation der Buttersäure und zur weiteren Oxydation der Acetessigsäure gebrauchte Sauerstoff der Atmung entspricht, während er in Phosphatringer nur die Hälfte davon ausmacht.

Tabelle VII.

$\Delta_{O_2}^{\text{Butyrat}}$	$\Delta_{O_2}^{\text{Acetessigsäure}}$	Prozentualer Teil von $\Delta_{O_2}^{\text{Butyrat}}$ gebraucht zur Bildung von			
		Acetessigsäure	β-Oxybuttersäure	Gesamtsumme der Ketonkörper	
0,8	0,5	60	32	92	Bicarbonatringer
1,8	0,5	12	38	50	Phosphatringer

Die vorliegenden Versuche machen es wahrscheinlich, daß das Molekül der Buttersäure in Phosphatringer nicht nur in Ketonkörper umgewandelt wird, sondern auch noch weiter abgebaut werden kann und vielleicht auch anders als in β-Stellung oxydiert wird. Da der Prozeß der β-Oxydation nur zu Sauerstoffverbrauch führt, während ein weiterer Abbau zur Bildung von Kohlensäure führen könnte, habe ich festzustellen versucht, ob in Gegenwart von Buttersäure die Kohlensäurebildung zunimmt.

Ich habe den respiratorischen Quotienten der Leber in Gegenwart von Natriumbutyrat gemessen unter Anwendung des Verfahrens, das ich in der nachstehenden Notiz beschreibe, und habe ihn mit dem respiratorischen Quotienten der Leber in Ringerlösung (ohne Glucose) verglichen.

Die Messungen wurden in Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$, gepuffert mit $6{,}6 \cdot 10^{-3}$ mol. Phosphat), die zur Messung in Buttersäure $2{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol. pro Liter Natriumbutyrat enthielt, ausgeführt. Das Natriumbutyrat wurde in Phosphatpuffer in solcher Konzentration zugegeben, daß es beim Vermischen mit der Ringerlösung die gewollte Konzentration ergab. Die Messung des verbrauchten Sauerstoffs und des von dem Gewebe gebildeten Kohlendioxyds geschah nach der in der nachstehenden Arbeit beschriebenen Methode. Die Gewebeschnitte wurden bei 37,5° gehalten, und der Versuch dauerte 1 Stunde.

Tabelle VIII.

Nr.	Kontrolle		Natriumbutyrat $2{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol.		Nr.	Kontrolle		Natriumbutyrat $2{,}3 \cdot 10^{-3}$ mol.	
	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}		Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}
1	6,9	4,9	9,2	6	4	4,9	4,3	6,8	4,5
2	4,9	3,6	6,3	4,5	5	8,6	6,8	12	9
3	6	5,2	9,4	6,9					

Tabelle VIII zeigt, daß die Gegenwart von Natriumbutyrat nicht nur den Sauerstoffverbrauch, sondern auch die Bildung von Kohlensäure seitens der überlebenden Leberschnitte vergrößert. Dies ist ein Beweis dafür, daß das Molekül der Buttersäure von den Schnitten nicht nur zu β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure oxydiert wird, sondern noch einen weiteren Abbau erleidet. Es ist wahrscheinlich, daß sich die Kohlensäure teils durch Decarboxylierung der aus dem Gewebe gebildeten Acetessigsäure, teils auch infolge einer weiteren Oxydation der letzteren bildet. Eine nähere Untersuchung darüber soll später erfolgen.

Zusammenfassung.

1. Eine Bilanz zwischen der Atmung der Leberschnitte von Meerschweinchen in Gegenwart von Natriumbutyrat und der Bildung von Ketonkörpern wird aufgestellt. Man beobachtet, daß die Atmung und die Gesamtbildung der Ketonkörper und das Verhältnis $\frac{\beta\text{-Oxybuttersäure}}{\text{Acetessigsäure}}$ in Phosphatringer größer ist als in Bicarbonatringer.

2. Die β-Oxybuttersäure wird bei einer Konzentration von 10^{-3} mol. von den Schnitten wenig oxydiert unter Bildung kleiner Mengen von Acetessigsäure: die Acetessigsäure wird bei der gleichen Konzentration teils zu β-Oxybuttersäure reduziert, teils unter Verbrauch von freiem Sauerstoff oxydiert. In Bicarbonatringer verläuft die Reaktion β-Oxybuttersäure $\rightleftarrows$ Acetessigsäure mit gleicher Geschwindigkeit in beiden Richtungen, in Phosphatringer mit größerer Geschwindigkeit von rechts nach links.

3. Der respiratorische Quotient der Meerschweinchenleber in Phosphatringer wurde in Abwesenheit und in Gegenwart von Natriumbutyrat gemessen. In Gegenwart von Butyrat nimmt nicht nur der Sauerstoffverbrauch zu, sondern auch in geringerem Grade die Bildung von Kohlensäure seitens der Schnitte.

Literatur.

1) *V. B. Wigglesworth*, Biochem. J. **18**, 1217, 1924. — 2) *J. H. Quastel* u. *A. H. M. Wheatley*, ebenda **27**, 1735, 1933; **29**, 2773, 1935. — 3) *F. P. Mazza* u. *G. Stolfi*, Rend. Acc. Lincei (6) **17**, 476, 1933; *F. P. Mazza* u. *C. Zummo*, ebenda (6) **18**, 461, 1933; *F. P. Mazza*, Arch. Sc. Biol. **21**, 320, 1935. — 4) *L. Califano*, Lo Sperim. **88**, 325, 1934. — 5) *N. L. Edson*, Biochem. J. **29**, 2082, 1935. — 6) *M. Jowett* u. *J. H. Quastel*, ebenda **29**, 2143, 2159, 2181, 1935. — 7) *D. D. van Slyke*, J. of biol. Chem. **32**, 455, 1917; *D. D. van Slyke* u. *R. Fitz*, ebenda **32**, 495, 1917; **39**, 23, 1919. — 8) *I. Snapper* u. *A. Grünbaum*, diese Zeitschr. **181**, 410, 418, 1927. — 9) *G. Embden*, *H. Salomon* u. *F. Schmidt*, Hofm. Beitr. **8**, 129, 1906; *G. Embden* u. *L. Michaud*, ebenda **11**, 332, 1908. — 10) *A. J. Wakeman* u. *H. D. Dakin*, J. of biol. Chem. **6**, 373, 1909; **8**, 105, 1910. — 11) *R. Stöhr*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **237**, 165, 1935. — 12) *J. Kühnau*, diese Zeitschr. **200**, 29, 1928; Ber. ü. d. ges. Phys. **72**, 287, 1933. — 13) *G. Ljunggren*, diese Zeitschr. **145**, 422, 1924.

Bemerkung zur Bestimmung des respiratorischen Quotienten von Gewebsschnitten in Phosphatringer.

Von

Enrico Ciaranfi.

(Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie der K. Universität Florenz.)

(Eingegangen am 17. Februar 1936.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei der Ermittlung des respiratorischen Quotienten in phosphatgepufferten Lösungen verfährt man so, daß man die vom Gewebe gebildete und an die Puffersubstanz gebundene Kohlensäure am Ende des Versuchs durch Hinzufügen von Säure in Freiheit setzt und manometrisch bestimmt. Diese Technik, die schon von *Warburg* und *Yabusoe*[1] zum Studium der Autoxydation der Fructose gebraucht worden ist, wurde auch zur Messung der Gewebeatmung von *Richardson*[2], *Dickens* und *Simer*[3], *Quagliariello* und *Scoz*[4] angewandt. Bei Versuchen mit Gewebsschnitten ist es dabei wichtig, die Kohlensäuremenge zu kennen, die in den Schnitten am Anfang des Versuchs vorgebildet ist, ein Wert, der dann von der durch Ansäuern gefundenen Gesamtmenge der CO_2 abgezogen wird.

Um die präformierte Kohlensäure zu bestimmen, legen die genannten Autoren einen Gewebsschnitt in das Gefäß mit Phosphatringer, stellen das Wärmegleichgewicht her und messen dann nach dem Ansäuern die Kohlensäure manometrisch. Dabei wird angenommen, daß die in den Schnitten vorgebildete Kohlensäure dem Gewicht der Schnitte proportional sei. Diese Voraussetzung ist nun, wie ich festgestellt habe, in ungefähr neutralen oder schwach alkalischen gepufferten Lösungen niemals erfüllt, wohl aber in ungepufferter Ringerlösung, welche freies CO_2 unter sehr niedrigem Partialdruck enthält. Ein kurzes Verbleiben der Schnitte in dieser Lösung, die ein p_H von ungefähr 4,6 (elektrometrisch gemessen) hat, schädigt die Atmung nicht.

Ich verfahre deshalb in folgender Weise: zuerst bleiben die Schnitte 10 Minuten lang in den *Warburg*schen Gefäßen, die ungepufferte Lösung enthalten; dann wird in zwei Gefäßen die vorgebildete Kohlensäure bestimmt, in den übrigen Gefäßen die nötige Menge Puffersubstanz hinzugefügt, um ein p_H von 7,2 herzustellen, und nach einer Stunde der verbrauchte Sauerstoff und die vom Gewebe gebildete Kohlensäure gemessen.

[1] *O. Warburg* u. *M. Yabusoe*, diese Zeitschr. **146**, 380, 1924. — [2] *H. B. Richardson*, Physiol. Rev. **9**, 61, 1929. — [3] *F. Dickens* u. *F. Simer*, Biochem. J. **24**, 905, 1930. — [4] *G. Quagliariello* u. *G. Scoz*, Boll. Soc. It. Biol. sper. **5**, 1117, 1930.

Die Beziehung zwischen der vorgebildeten Kohlensäure und dem Gewicht der Schnitte in nicht gepufferten Lösungen, die CO_2 enthalten, ergibt sich aus folgenden Versuchen:

Man füllt in den seitlichen Anhang einiger *Warburg*-Gefäße 0,4 ccm 4%iger Citronensäure und in den Mittelteil 5 ccm Ringerlösung ohne Puffer, gesättigt mit einer Mischung von 0,25% CO_2 und O_2. In die Gefäße bringt man Gewebsschnitte von verschiedenem Gewicht, befestigt die Gefäße an den Manometern und verdrängt die Luft durch die angegebene Mischung von CO_2 und O_2. Nachdem die Gefäße 10 Minuten lang bei 37,5° bei offenem Manometer geschüttelt worden sind, stellt man auf Null ein, schließt das Manometer und kippt die Citronensäure in die Ringerlösung. Der beobachtete Druck ergibt, mit der Gefäßkonstante multipliziert, den Wert für die an das System: Gewebe—Ringer gebundene Kohlensäure. Die in der Ringerlösung enthaltene Kohlensäure wird in einem Kontrollversuch bestimmt und berücksichtigt.

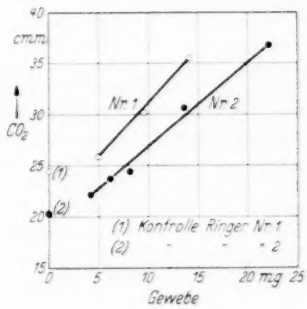


Abb. 1.

Die Ergebnisse zweier Versuche, die als Beispiel in Abb. 1 dargestellt sind, zeigen, daß in ungepufferten Lösungen, die freies CO_2 enthalten, die CO_2-Menge nach der Gleichgewichtsperiode dem Gewicht der Schnitte proportional ist. Die Proportionalitätskonstante ist jedoch verschieden in den einzelnen Versuchen und muß jedesmal experimentell festgestellt werden. Kennt man die Werte für zwei Gewebsschnitte von verschiedenem Gewicht, so kann man durch Interpolieren den CO_2-Gehalt von Schnitten, deren Gewicht dazwischen liegt, ermitteln.

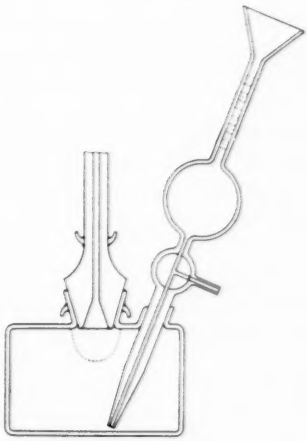


Abb. 2.

Um nach Bestimmung der in den Schnitten vorgebildeten Kohlensäure die Atmung zu ermitteln, muß man in der Ringerlösung ein geeignetes p_H herstellen können. Man erreicht das durch folgende einfache Einrichtung:

An einem *Warburg*-Gefäß (Abb. 2) ist eine graduierte Bürette angeschliffen, die mit einem Dreiwegehahn versehen ist und mit einer dünnen Pipette in das Gefäß hineinreicht, die beinahe den Boden berührt. Nachdem

man in das Gefäß die nötige Menge durch Kohlensäure angesäuerter Ringerlösung gegeben hat, saugt man die Flüssigkeit in die Pipette bis zur Höhe des Hahnes, schließt diesen und füllt die Bürette mit einer Pufferlösung vom gewünschten p_H. Im gegebenen Moment dreht man den Hahn, ohne das Gefäß aus dem Wasserbad zu nehmen, und läßt in die Ringerlösung bei geöffnetem und ruhiggestelltem Manometer die gewünschte Menge Puffersubstanz hineinlaufen. Die Pufferlösung schichtet sich auf dem Boden des Gefäßes, ohne mit dem Gasraum in Berührung zu kommen. Man wartet ungefähr $^1/_2$ Minute, bis der Innendruck mit dem atmosphärischen Druck im Gleichgewicht ist, schließt den Hahn und setzt erst jetzt das Manometer in Bewegung. Der Phosphatpuffer absorbiert die CO_2 des Gasraumes, die in der Flüssigkeit gelöste und die von dem Gewebe während der Atmung abgegebene CO_2. Am Schluß des Versuchs läßt man die Citronensäure in den Ringer fließen, wobei das an das System gebundene CO_2 als Gas frei wird. Das entwickelte CO_2 besteht aus: 1. dem im Gewebe am Anfang des Versuchs vorgebildeten CO_2, 2. dem CO_2, das vor der Hinzugabe des Puffers im Ringer gelöst war, 3. dem vorher an den Puffer gebundenen CO_2, 4. dem von dem Gewebe während des Atmungsversuchs gebildeten CO_2. Da wir die 1., 2., 3. entsprechenden Werte messen können, kennen wir auch den Wert für 4., d. h. für das von dem Gewebe gebildete CO_2.

Ist bei der alkoholischen Zuckerspaltung in der Zelle die Phosphorylierung zwangsläufig?

Beitrag zur Biochemie von *fusarium lini B.*

I. Mitteilung:

(13. Mitteilung zum Mechanismus der Enzymwirkung[1]).

Von

F. F. Nord, Else Dammann und **Heinrich Hofstetter,**

mit Versuchen von **Vera Senftner** und **Elfriede Rosdorff.**

(Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 24. Februar 1936.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

Einführung.

Die Anschauungen über die Notwendigkeit der Phosphorylierung im Getriebe des Kohlenhydratstoffwechsels gehen weit auseinander. Die kontinentalen Forscher[2] halten sich für mehr oder weniger berechtigt, aus Versuchen, die mit Hefe- oder Muskel*säften* bzw. *Präparaten*[3] ausgeführt wurden, den Schluß zu ziehen, daß die Entstehung der Phosphorsäureester auch in der lebenden Zelle den weiteren Zerfall der Kohlenhydrate einleiten *muß*.

Von den Britischen Autoren lieferten namentlich *Ashford* und *Holmes*[4] experimentelle Unterlagen für die Möglichkeit, daß in Gehirnzellen die Milchsäure aus Glukose *ohne* Mitwirkung von Phosphaten entsteht. Und *Harden*[5] formulierte jüngst seine Auffassung über die obige Frage in folgender Weise:

„They throw no further light on the initial changes and particularly on the accumulation of hexosephosphates which accompanies the breakdown of carbohydrate in presence of phosphate in all preparations of muscle and yeast, but apparently not in the living organism."

Dies kann eindeutig auch aus den Urversuchen von *Harden* und *Young*[6] belegt werden, weshalb wir seit mehreren Jahren[7] die Auffassung vertreten haben, „daß die Zymophosphatbildung bei der

[1] 12. Mitteilung: diese Zeitschr. **263**, 353, 1933. — [2] Vgl. *F. F. Nord*, Angew. Chem. **47**, 491, 1934; Chem.-Ztg. **59**, 305, 1935; wegen der älteren Literatur vgl. Chem. Reviews **3**, 41, 1926. — [3] Eine Ausnahme hiervon ist in der jüngsten Mitteilung von *C. Neuberg* (diese Zeitschr. **280**, 163, 1935) zu erblicken, der allerdings als Substrat bei seinen Versuchen nicht ein KH, sondern einen Monoester verwendete. — [4] Biochem. J. **23**, 748, 1929. — [5] J. Inst. of Brewing **39**, 646, 1933. — [6] Proc. Roy. Soc. B **77**, 405, 1906. Ergebnisse der Enzymforschung **1**, 113, 1932. — [7] *F. F. Nord*, Mechanism of enzyme action and ass. cell phenomena S. 11, Baltimore, Md. 1929.

Gärung mit lebenden Zellen keinen ihrem Wesen eigenen Vorgang darstellt, sondern eine nebenher verlaufende Reaktion, welche lediglich unter z. B. bei der zellfreien Gärung erzwingbaren Versuchsbedingungen und hohen Phosphatmengen in den Vordergrund gedrängt werden kann".

Die Versuche von *Harden* und *Young* bzw. *Iwanow* haben ergeben, daß durch Zusatz von Alkaliphosphat die Geschwindigkeit einer „zellfreien" Gärung erhöht werden kann; sobald aber das Alkaliphosphat aufgebraucht und in Zymophosphat umgesetzt ist, sinkt die Gärgeschwindigkeit, und ist kein anorganisches Phosphat mehr vorhanden, so beträgt sie ebensowenig wie beim Saft ohne Phosphate. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß die Bildung von Zymophosphaten auch für die *lebende* Zellgärung eine unausbleibliche Phase darstellt. Demgegenüber kann nicht übersehen werden, daß 1. die Beschleunigung der Gärung nur dann zu beobachten ist, wenn anorganisches Phosphat vorhanden ist, 2. eine Gärbeschleunigung nicht nur durch Phosphate, sondern auch durch andere Alkalisalze hervorgerufen werden kann, und 3. die Beschleunigung aufhört, sobald das Alkaliphosphat verbraucht ist.

Hieraus folgt, daß die Beschleunigung nicht mit dem Vorhandensein oder der Bildung des Zymophosphats in Zusammenhang zu bringen ist, und daß kein zwingender Grund vorliegt, um hieraus auf das biochemisch integrierende Durchlaufen einer Zymophosphatstufe zu schließen[1].

Eine weitere Stütze für diese Auffassung lieferten dann in diesem Rahmen ausgeführte Untersuchungen der Kinetik der Hefenzellgärung[2], in welchen wir den Einfluß verschiedener Rührgeschwindigkeiten auf den Reaktionsverlauf prüften. Es hat sich bei dieser Beeinflussung des Gäraktes herausgestellt, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen die für die Diffusionshemmungen im Außenmedium bisher verantwortlich gemachte Sedimentation der Zellen bereits bei einer Rührgeschwindigkeit von 20 Touren in der Minute aufgehoben wird. Bei einer bis zu 150 pro Minute steigenden Tourenzahl zeigte sich ein gleichmäßiger Anstieg der Gärgeschwindigkeit. Diese weitere Beschleunigung der Reaktion ist — da die Diffusionsunterschiede bereits bei einer Tourenzahl von 20 pro Minute ausgeglichen waren — lediglich auf die relative Membranbewegung gegenüber der Substratlösung bzw.

---

[1] Vgl. auch *C. Neuberg* u. *M. Kobel*, Ann. d. Chem. **465**, 276, 1928. — [2] 5. und 6. Mitteilung: Zeitschr. f. Elektrochem. **35**, 612, 1929; Protoplasma **10**, 41, 1930. Bestätigt wurden diese Versuche durch *Alf Klem*, Hvalradets Skrifter Nr. 7, S. 76, 1933 und *R. H. Hopkins* u. *R. H. Roberts*, Biochem. J. **29**, 919, 1935. Vgl. auch *F. F. Nord*, Zum Mechanismus der Enzymwirkung unter besonderer Berücksichtigung der Kryolyse, S. 15—24, Stuttgart 1933.

auf die hierdurch bedingte Membranoberflächenvergrößerung zurückzuführen, wodurch mehr Zucker in die Zelle zu permeieren vermag und umgesetzt werden kann.

Aus dem Vorhergesagten folgt, daß die Induktion bei der *lebenden* Zellgärung keine Bedeutung besitzt, woraus geschlossen werden kann, daß ein direkter Vergleich der zellfreien und Trockenhefegärung mit der lebenden Zellgärung erzwungen ist[1].

Das Enzymmaterial, das zum Vergleich mit dem Stoffwechsel der Hefezelle mit dem Anspruch, einwandfreie Analogieschlüsse zu ziehen, verwendet werden könnte, ist sehr spärlich. Am besten ist der Mechanismus des Abbaues von Zucker durch das *Thermobakterium mobile Lindner*[2] erforscht worden, welches nach *Kluyver* und *Hoppenbrouwer*[3] äquimolekulare Mengen Kohlensäure und Alkohol liefert. Als Nebenprodukt entsteht Milchsäure, während der Zucker im ganzen zu rund 95% vergoren wird. Die Befunde, die dann von *Neuberg* und *Kobel*[4] erweitert wurden, zeigen, daß ein wie Hefepilze arbeitendes Bakterium in der Natur tätig ist.

Ein mehrzelliger Erreger, dessen Biologie in weitgehendstem Maße untersucht wurde, ist das *fusarium lini Bolley*[5] (flB.), der Erreger des Flachsbrandes. Die Erforschung der biochemischen Leistungen seines Enzymsystems ist aber bisher aus dem Zustand grundsätzlicher Feststellungen nicht herausgekommen. Diese verdanken wir in erster Linie einer Arbeit von *A. K. Anderson*[6], der fand, daß das flB. sowohl Hexosen, als auch Pentosen vergärt. Hierbei konnte auch das Auftreten von Acetaldehyd als Zwischenprodukt festgestellt werden[7]. Das Verhältnis zwischen Kohlensäure und Äthylalkohol ist im Falle der Vergärung der Hexosen fast annähernd übereinstimmend mit dem einer typischen Hefegärung. Das Verhältnis des Kohlenstoffes im Alkohol zum Kohlenstoff in der Kohlensäure ist im Falle einer Pentose 1 : 1 im Unterschied zum Verhältnis 2 : 1, wenn der Erreger auf Glucose wächst.

---

[1] Vgl. hierzu auch *F. Hofmeister*, Die chemische Organisation der Zelle, S. 8, Braunschweig 1901: „. . . so wenig der Biochemiker durch chemische Analyse einer zertrümmerten Taschenuhr deren regelmäßigen Gang erklären könne, ebensowenig sei von der chemischen Untersuchung des toten und zertrümmerten Protoplasmas eine Aufklärung über dessen Lebenserscheinungen zu erwarten". — [2] *P. Lindner*, Zeitschr. d. Vereins deutsch. Zuckerindustr. **81**, 25, 1931. — [3] Arch. f. Mikrobiol. **2**, 245, 1931. — [4] Diese Zeitschr. **243**, 451, 1931; **247**, 246, 1932. — [5] *H. L. Bolley*, North Dakota Experimental Station Bulletin **50**, 27—58, 1901; *O. Appel* u. *H. W. Wollenweber*, Arbeiten aus der kaiserlichen Biolog. Anstalt **8**, 1—207, 1910; vgl. auch *H. Grossmann*, Dissert. Zürich 1934 und *G. Luz*, ebenda 1934. — [6] Dissert. University of Minnesota 1924. Wegen weiterer Literatur vgl. *F. F. Nord*, Mechanism of Enzyme Action and Associated Cell Phenomena, Baltimore 1929, Bibliographie Nr. 2, 70, 163, 174 und *H. Raistrick* u. Genossen, Philos. Transact. B **220**, 93, 1931. — [7] *H. Letcher* u. *J. J. Willamann*, Phytopathology **16**, 941, 1926.

Darüber hinaus besitzt dieser Erreger ein sehr kräftiges Dehydrasensystem, welches ihn befähigt, Äthylalkohol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten und unter Erzeugung von Kohlensäure zu dehydrieren. Auch in dieser Hinsicht ist dieses Enzymsystem mit dem Fermentsystem der Hefe zu vergleichen, welche allerdings erst nach Befreiung von den zelleigenen Reservestoffen durch 20stündiges Schütteln mit Sauerstoff Äthylalkohol zu dehydrieren vermag[1].

Für die Vergleichbarkeit des Leistungsmechanismus des Fermentsystems der Hefe mit dem des flB. spricht schließlich die gesicherte Angabe von *Mahdihassan*[2], nach welcher die innere H-Ionenkonzentration von Hefe XII bzw. flB. im Bereich von 5,9 bis 6 bzw. 6 und 6,1 liegt.

Abgesehen von der Ähnlichkeit der biochemisch, biophysikalisch-chemisch und stöchiometrisch erfaßbaren Wirkungsweise des Enzymsystems von Hefe, Thermobakterium und flB. bietet das letztere System den Vorzug, daß der Reaktionsverlauf langsam und dementsprechend gedehnter ist. Dies gibt wiederum die Möglichkeit, in den Chemismus und die Kinetik gerade der ersten Phasen der Dissimilation der Kohlenhydrate Einblick zu gewinnen, der bei dem raschen Verlauf bei der unversehrten Hefezelle praktisch sehr erschwert ist, deshalb manchen Forscher zum Einschlagen von Umwegen zwang, die zwar Ergebnisse gezeitigt haben, die zum Teil als feste Grundlage dastehen, aber gleichzeitig zum Ausgangspunkt von Deutungen wurden, die an Zwangsvorstellungen grenzen[3].

Um die Frage des Mechanismus der ersten Phasen des Kohlenhydratabbaues bzw. der Alkoholdehydrierung mit flB. eingehend zu studieren, haben wir grundsätzlich mit lebenden Zellen und mit Trockenpräparaten gearbeitet und als Substrate einerseits Glucose, Fructose und Mannose, d-Arabinose und d-Xylose, andererseits Äthylalkohol und Polyvinylalkohol herangezogen. Außerdem wurden in entsprechenden Phasen als Ergänzung zu dem biochemisch-analytischen Vorgehen die morphologischen Veränderungen des Zellsystems photographisch festgehalten.

Diese Vergleiche sind von großem Interesse und bieten besondere Einblicke in den Zusammenhang zwischen Reaktionsverlauf und Zustandsänderung der Zelle, die bei der Hefe zu beobachten infolge der raschen Phasenfolge bisher nicht gelungen ist.

Für die Förderung dieser Untersuchung sei der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, dem Reichskuratorium für Technik in der Landwirtschaft, der wissenschaftlichen Akademikerhilfe und der I. G. Chemikerhilfe aufrichtig gedankt. Für die Überlassung von Materialien sind wir auch der I. G. Farbenindustrie A.-G., Werke AGFA und Höchst, sehr verbunden.

[1] *H. Wieland, O. B. Claren* u. *F. Wille*, Ann. **492**, 183, 1932; **503**, 70, 1933. — [2] Diese Zeitschr. **226**, 203, 1930; vgl. *H. Pfeiffer*, Protoplasma **12**, 472, 1931. — [3] Vgl. *Liebig* an *Wöhler*: „An Versuchen und Tatsachen ist kein Mangel, aber an Verständnis derselben."

Verfahren und Methoden.

Für unsere Arbeiten stand uns ein Stamm des flB. aus der biologischen Reichsanstalt Berlin-Dahlem zur Verfügung. Für die Massenzüchtung[1] des Erregers verwendeten wir stets folgende Nährlösung vom p_H 6,8. Auf je 1000 ccm Aqua dest.:

10 g Kartoffelstärke
2 g Traubenzucker
0,2 g Asparagin
1,25 g K_2HPO_4 *
0,75 g $MgSO_4 . 7 H_2O$

Diese Lösung wurde $1^1/_2$ Stunden sterilisiert, am nächsten Tage in Kulturkolben abgefüllt und dann an zwei hintereinander folgenden Tagen zweimal je eine halbe Stunde lang strömendem Wasserdampf ausgesetzt. Als Impfmaterial kam teils Sporenlösung aus einer auf derselben Nährlösung wachsenden Kultur, teils Trockenpräparat zur Verwendung. Späterhin wurde noch ein Teil der Nährlösung stets mit dem auf in heißem Wasser gequollenen Leinsamen gezüchteten flB. geimpft. Die Kulturen wurden fortlaufend mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft. Zur Gewinnung von Trockenpräparaten wurde das Mycelium nach zwei- bis dreiwöchigem Wachstum (im Brutschrank bei 28° C) von der Nährlösung getrennt, mit sterilem Leitungswasser gründlich ausgewaschen und mehrere Male mit sterilem Leitungswasser zentrifugiert. Das so gewonnene Präparat wurde nach Vortrocknen auf Ton 1 Tag lang im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure belassen und darauf in steril gemachte Flaschen zur Aufbewahrung gebracht.

Um den Gang der Vergärung und das Verhalten des Erregers in Gegenwart von anorganischem Phosphat zu beobachten, wurden zahlreiche Reihenversuche ausgeführt. In jeder der Reihen wurden sechs Einzelversuche mit je 50 ccm Substratlösung angesetzt. Sie teilten sich grundsätzlich folgendermaßen auf: je ein Doppelversuch lebend geimpft, mit dem Trockenpräparat versetzt und die dazugehörigen P-freien Kontrollen. Die Zusammensetzung der beiden zur Verwendung kommenden Nährlösungen war die folgende:

I. (Mit Phosphat berechnet auf Monoester):

50 g H_2O
1 g Kohlenhydrat
0,01 g Asparagin
0,04 g $MgSO_4 . 7 H_2O$
0,75 g KH_2PO_4 (im Falle einer Hexose)
0,90 g KH_2PO_4 (im Falle einer Pentose)

II. (Ohne Phosphat):

50 g H_2O
1 g Kohlenhydrat
0,01 g Asparagin
0,04 g $MgSO_4 . 7 H_2O$

[1] Für die entgegenkommende Überlassung eines Laboratoriums und der Einrichtungen im Hygienischen Institut der Universität sind wir Herrn Prof. Dr. *Zeiss* zu großem Dank verpflichtet. — * Um die Möglichkeit einer unbeabsichtigten Fluoridhemmung auszuschalten, wurde die Warnung von *A. Harden* (Nature **134**, 101, 1934) stets berücksichtigt.

Die Versuchslösung wurde vor dem Einpipettieren mit steriler Pipette in die Versuchskolben an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine halbe Stunde im Dampftopf sterilisiert, ebenso wurde mit den Versuchskolben selbst verfahren. An Stelle des Gummischlauchverschlusses wurden die Kolben während der Sterilisation an den Glasrohrenden durch Wattepfropfen verschlossen.

Nach dem Impfen des Substrates wurden die Versuchskolben paraffiniert, mit Klemmschrauben versehen und während der Versuchsdauer bei 28° C im Brutschrank aufbewahrt. In bestimmten Abständen, die aus den Tabellen ersichtlich sind, wurden Kohlensäurebestimmungen ausgeführt. Nach jeder Kohlensäureentfernung wurde aus dem phosphathaltigen Substrat mit steriler Pipette 1 ccm entnommen, mit Aqua dest. auf 50 ccm aufgefüllt, zur Haltbarmachung ein paar Tropfen Chloroform hinzugefügt und zur Phosphorbestimmung verwendet. Der entstandene Alkohol wurde am Ende jeden Versuchs bestimmt.

Zur praktischen Durchführung der Bestimmung

1. der Kohlensäure nach *Truog*[1],

2. des Alkohols nach *Dox* und *Lamb*[2] und der Kontrolle

3. der Phosphatbindung nach *Briggs*[3] empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen folgendes Vorgehen:

Die *Kohlensäure* wird in einem $Ba(OH)_2$-Turm aufgefangen und die überschüssige Lauge mit n/1 HCl gegen Phenolphthalein zurücktitriert. Während jeder Kohlensäurebestimmung wird vor den $Ba(OH)_2$-Turm ein H_2SO_4-Turm (beschickt mit 30 ccm konz. Schwefelsäure) geschaltet, um den eventuell mitgerissenen Alkohol aufzunehmen. In diesem Turm wird am Ende des Versuchs der Gesamtalkohol bestimmt. Die Luft, die $1^1/_2$ bis 2 Stunden lang langsam durch die Apparatur gesaugt wird, wird in einer Kalilaugewaschflasche, der ein Natronkalkröhrchen vorgeschaltet ist, von Kohlensäure befreit. Nach Beendigung der Kohlensäurebestimmung wird die Versuchslösung mit Ammonsulfat gesättigt und 24 Stunden lang kohlensäurefreie Luft zum Austreiben des *Alkohols* durchgesaugt. Der Inhalt des Schwefelsäureturmes wird dann in einen *Claisen*-Kolben übergeführt und mit einer Lösung von 30 g Kaliumbichromat versetzt, gut durchgemischt und zur Oxydation 20 Minuten stehengelassen. Danach wird die entstandene Essigsäure destilliert und mit n/5 Kalilauge gegen Phenolphthalein titriert. Da neben der Essigsäure auch gegen Ende stets etwas Schwefelsäure mit überdestilliert, andererseits aber auch etwas Essigsäure im Rückstand bleibt, wurde folgendermaßen verfahren: Die Hauptmenge des Kolbeninhalts wurde in zwei Portionen überdestilliert und titriert. In dieser Fraktion wird die größte Menge der vorhandenen Essigsäure gewonnen. Zu dem Rest wurden 100 ccm dest. Wasser gegeben, davon 50 ccm abdestilliert und titriert. Diese 50 ccm wurden viermal ersetzt, wieder destilliert und zur Hauptdestillation zugerechnet. Die letzte Nachdestillation verbrauchte zwischen 0,4 und 0,6 ccm n/5 KOH. Versuche mit bekanntem Alkoholgehalt ergaben durchschnittlich 97 bis 103 % des theoretisches Wertes.

---

[1] J. of Industrial and Engineering Chemistry **7**, 1045—1049, 1915. — [2] J. Amer. Chem. Soc. **38**, 2562—2568, 1916. — [3] J. of biol. Chem. **59**, 255, 1924.

Zur Durchführung der *Briggs*schen *Phosphorbestimmung* wurden 10 ccm-Meßkolben verwendet. In den einen Kolben wurde 1 ccm der Vergleichslösung (die 0,1 mg P in 1 ccm enthielt), in den zweiten 1 ccm der Versuchslösung gebracht. Dann wurde in jeden der Kolben hinzupipettiert:

3 ccm dest. Wasser
1 „ Trichloressigsäure
1 „ einer Ammonmolybdatlösung in 5 n H_2SO_4
1 „ einer 1 %igen Hydrochinonlösung
1 „ Na-Sulfitlösung, 20 %ig,

und auf 10 ccm aufgefüllt. Nach halbstündigem Stehen wurde kolorimetriert, und zwar durch Einstellen der Versuchslösung auf 30 mm und 40 mm Schichthöhe.

Unsere Erfahrungen bei den Schwankungen der opt. Beobachtungen stimmen mit denen von *Martland* und *Robison*[1] überein. Um die Genauigkeit der Methode auszuprobieren, wurden einige Blindversuche ausgeführt, die in Tabelle I verzeichnet sind. Es wurden ungefähr 750 mg KH_2PO_4 in 50 ccm gelöst, davon 1 ccm entnommen, im Meßkolben auf 50 ccm aufgefüllt, und aus dieser Lösung an verschiedenen Tagen zur Bestimmung 1 ccm herauspipettiert.

Tabelle I. Blindversuche zur Phosphorbestimmung.

Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Datum	1 ccm der Versuchslösung enthält mg P	50 ccm der ursprünglichen Lösung enthalten mg P	Datum	1 ccm der Versuchslösung enthält mg P	50 ccm der ursprünglichen Lösung enthalten mg P	Datum	1 ccm der Versuchslösung enthält mg P	50 ccm der ursprünglichen Lösung enthalten mg P
1. III.	0,068	170	6. IV.	0,068	170	1. VII.	0,070	175
2. III.	0,068	170	7. IV.	0,068	170	2. VII.	0,070	175
4. III.	0,067	167,5	8. IV.	0,068	170	3. VII.	0,070	175
5. III.	0,068	170	9. IV.	0,069	172,5	4. VII.	0,071	177,5
7. III.	0,067	167.5	10. IV.	0,068	170	5. VII.	0,071	177,5
9. III.	0,068	170	11. IV.	0,068	170	6. VII.	0,070	175
			16. IV.	0,068	170	10. VII.	0,071	177,5

Fehlergrenze: $\pm$ 0,001 mg P.

Versuche.

a) Hexosen.

Im Glucoseversuch (Tabelle II), im Mannoseversuch (Tabelle III) und im Fructoseversuch (Tabelle IV) wurde folgendermaßen verfahren: Kolben I, II, III und IV enthielt Substrat mit Phosphatzusatz, die Versuchslösungen in Kolben V und VI waren phosphatfrei. Kolben I, II und V wurden in jedem Falle mit 10 ccm Sporenlösung geimpft. Als Impfungsmaterial für Kolben III, IV und VI wurde 150 mg des Trockenpräparates verwendet. Die Versuche wurden bis zum Verbrauch des Zuckers teilweise auch etwas länger laufen gelassen. Theoretisch könnten

[1] Biochem. J. **20**, 848, 1926.

Tabelle II. Reih

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosph
züchtung. Impfmaterial für Versuch

Datum 1935	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg
30. VI.	—	160	—	160	—	175
1. VII.	13,2	160	6,6	160	8,8	175
2. VII.	26,4	160	22,0	160	33,0	172
3. VII.	77,0	152,5	79,2	155	127,6	170
4. VII.	110,0	155	123,2	150	70,4	167
5. VII.	90,2	160	70,4	160	74,2	172
6. VII.	70,4	155	61,6	160	68,2	175
7. VII.	39,6	162,5	48,4	160	33,0	177
8. VII.	33,0		37,4		44,0	
10. VII.	26,4		33,0		33,0	
12. VII.	22,0		28,6		24,2	
14. VII.	22,0		22,0		22,0	
16. VII.	8,8		8,8		11,0	
Summe	539,0 mg CO_2 314,2 „ C_2H_5OH		541,2 mg CO_2 309,4 „ C_2H_5OH		549,4 mg CO_2 299,8 „ C_2H_5OH	

Tabelle III. Reih

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosp
Massenzüchtung. Impfmaterial für Vers

Datum 1935	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg
3. VI.	—	160	—	162,5	—	175
4. VI. morgens	0	160	0	162,5	0	175
4. VI. abends	44,0	160	88,0	162,5	77,0	175
5. VI.	77,0	160	8,8	162,5	44,0	175
6. VI.	50,6	152,5	15,4	155	50,6	167
8. VI.	35,0	152,5	121,0	155	109,8	165
11. VI.	149,6	150	132,0	155	55,0	165
13. VI.	63,8	160	57,2	160	46,2	172
15. VI.	33,0	160	46,2	162,5	55,0	175
18. VI.	30,8	160	28,6	162,5	26,4	177
24. VI.	39,6	160	41,8	162,5	35,2	177
Summe	523,4 mg CO_2 420,0 „ C_2H_5OH		539,0 mg CO_2 490,5 „ C_2H_5OH		499,2 mg CO_2 488,0 „ C_2H_5OH	

aus 1 g Zucker 488,9 mg CO_2 und 511,1 mg Alkohol gebildet werden. Wenn die Gesamtmenge der entwickelten Kohlensäure ungefähr diesem Wert entsprach, war der Zucker in den meisten Fällen verbraucht. Jedoch lagen die Alkoholwerte ziemlich weit unter dem theoretischen Wert. Ein Zeichen dafür, daß bereits während des Kohlenhydratabbaues der entstandene Alkohol dehydriert wird.

rsuch mit Glucose.

satz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 10 ccm Sporenlösung aus der Massen- und 6: 150 mg Trockenpräparat.

Versuch 4		Versuch 5	Versuch 6
mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg CO_2
—	175	—	—
6,6	175	6,6	6,6
24,2	175	11,0	11,0
50,6	175	44,0	48,4
88,0	170	44,0	46,2
103,4	167,5	70,4	88,0
77,0	175	66,0	79,2
63,8	177,5	30,8	48,4
55,0		30,8	44,0
48,4		48,4	46,2
30,8		28,6	30,8
24,2		35,2	24,2
13,2		22,0	22,0
585,2 mg CO_2		437,8 mg CO_2	495,0 mg CO_2
300,0 „ C_2H_5OH		385,2 „ C_2H_5OH	392,0 „ C_2H_5OH

ersuch mit Mannose.

satz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 10 ccm Sporenlösung aus der 4 und 6: 150 mg Trockenpräparat.

Versuch 4		Versuch 5	Versuch 6
mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg CO_2
—	175	—	—
0	175	0	0
4,4	175	8,8	0
6,6	175	4,4	11,0
39,6	170	52,8	59,4
143,0	165	136,4	85,0
154,0	170	134,2	120,8
48,4	177,5	61,6	44,0
26,4	177,5	26,4	28,6
33,0	175	28,6	55,0
59,4	175	41,8	81,4
514,8 mg CO_2		495,0 mg CO_2	485,2 mg CO_2
492,1 „ C_2H_5OH		490,0 „ C_2H_5OH	409,6 „ C_2H_5OH

In den ersten 3 bis 5 Tagen nach der Impfung erreicht die Gärung meist ihr Maximum, eine durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure von 80 bis 120 mg. Danach nimmt die Gärgeschwindigkeit rasch ab, sinkt auf 30 bis 40 mg und nach 2 bis 3 Wochen entstehen nur noch 10 bis 15 mg Kohlensäure täglich. Neben den Kohlensäurewerten ist in den Tabellen der jeweilige Stand des Phosphorspiegels

eingetragen. Es ist daraus ersichtlich, daß stets erst *nach* dem Einsetzen der Kohlensäureentwicklung ungefähr 5% des verfügbaren anorganischen Phosphors verbraucht werden. Die sogenannte Induktionsperiode in dem bisher mißbrauchten Sinn konnte niemals beobachtet werden.

Nach einigen Tagen war immer der Phosphoranfangswert wieder erreicht. Eine reproduzierbare, stöchiometrische Beziehung in bestimmten Zeiten zwischen dem Verlauf des Vergärungs- und des Phosphorylierungsvorgangs konnte nicht festgestellt werden[1].

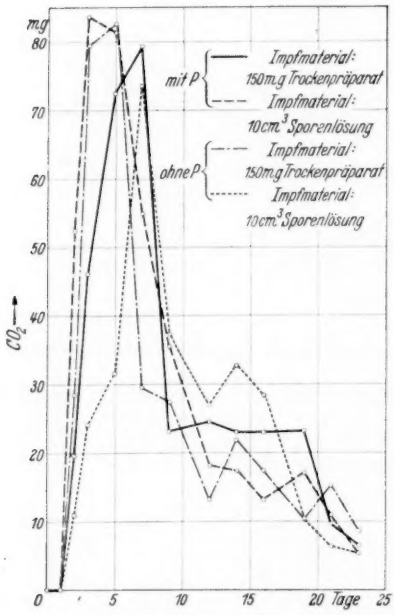


Abb. 1. Durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure bei Vergärung von Glucose.

Die Kohlensäureentbindung sowohl aus dem phosphathaltigen als auch dem phosphatfreien Substrat verlief innerhalb dieser Versuche sehr ähnlich (vgl. Abb. 1). In Betracht zu ziehen ist, daß nicht vollkommen P-frei gearbeitet wurde, da mit den 10 ccm Sporenlösung ungefähr 12,5 mg Phosphat mit in die Nährlösung gelangten. Ebenso führt die verhältnismäßig große Menge von 150 mg Trockenpräparat der Nährlösung so viel Phosphor zu, daß die kennzeichnenden Erscheinungen des P-Mangels nicht zu beobachten sind (vgl. morphol. Teil).

b) Hexosen und Pentosen.

Um eine praktisch P-freie Nährlösung zu erhalten, wurde die Leinsamenimpfmethode angewandt; d. h. es wurde flB. auf in heißem Wasser gequollenem Leinsamen gezüchtet und zum Impfen der phosphatfreien Nährlösung ein Leinsamenkorn mit anhaftendem Mycel entnommen. In der Tat wurde in diesen Versuchen die Gärgeschwindigkeit stark herabgemindert.

Als Substrate in den in den Tabellen V und VI aufgeführten Reihenversuchen wurde der Nährlösung Glucose bzw. Xylose zugesetzt. Diese

[1] Wie bei Hefesäften und mit Zymin. Vgl. auch *R. Robison*, The significance of phosphoric esters in metabolism, S. 20—21, New York 1932; *K. Lohmann* im Handbuch der Biochemie, Ergänzungsband, S. 146—147, Jena 1930; *F. F. Nord*, l. c. Fußnote 2, S. 233.

Tabelle IV. Reihenversuch mit Fructose.

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosphatzusatz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 10 ccm Sporenlösung aus der Massenzüchtung. Impfmaterial für Versuch 3, 4 und 6: 150 mg Trockenpräparat.

Datum	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	Versuch 6
1935	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg CO_2
1. IV.	—	150	—	150	—	175	—	175	—	—
2. IV.	6,6	150	13,2	150	0	175	0	175	13,2	15,4
3. IV.	22,0	150	19,8	150	101,2	160	11,0	175	17,6	33,0
4. IV.	35,2	150	19,8	150	55,0	165	22,0	165	26,4	50,6
5. IV.	46,2	142,5	63,8	145	57,2	175	63,8	162,5	61,6	59,4
8. IV.	171,6	145	74,8	145	127,6	177,5	162,8	175	151,8	138,6
9. IV.	57,2	150	46,2	150	35,2	177,5	61,6	175	39,6	37,4
11. IV.	35,2	150	63,8	152,5	61,6	177,5	94,6		50,6	63,8
12. IV.	26,4		41,8		26,4		24,2		22,0	22,0
15. IV.	33,0		72,6		44,0		46,2		35,2	46,2
17. IV.	33,0		66,0		33,0		37,4		22,0	22,0
Summe:	466,4 mg CO_2		481,8 mg CO_2		541,2 mg CO_2		523,6 mg CO_2		440,0 mg CO_2	488,4 mg CO_2
	325,4 mg C_2H_5OH		333,1 mg C_2H_5OH		264,4 mg C_2H_5OH		270,8 mg C_2H_5OH		350,4 mg C_2H_5OH	347,0 mg C_2H_5OH

Tabelle V. Doppelversuch mit Glucose.

Versuch 1 und 2 bis zum 8. Oktober ohne anorganischen Phosphatzusatz, am 8. Oktober Nachgabe von anorganischem Phosphor in beide Versuchskolben.

Datum	Versuch 1		Versuch 2	
1935	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P
2. IX.	—		—	
4. IX.	6,6		8,8	
6. IX.	8,8		11,0	
9. IX.	20,0		15,4	
13. IX.	46,2		48,4	
18. IX.	66,0		41,8	
24. IX.	59,4		50,6	
1. X.	92,4		55,0	
8. X.	74,8	172,5	48,4	172,5
10. X.	52,8	165	50,6	160
12. X.	59,4	175	83,6	170
14. X.	85,8	175	92,4	175
16. X.	8,8	175	37,4	175
Summe:	571,0 mg CO_2 458,9 mg C_2H_5OH		543,4 mg CO_2 465,2 mg C_2H_5OH	

ganze Serie wurde mit je einem Leinsamenkorn mit anhaftendem Mycel aus einer 4 Tage alten Kultur geimpft.

Die Glucose weist eine ganz auffallend geringe Gärgeschwindigkeit auf (wie ein Vergleich mit den Glucoseversuchen der Tabelle II zeigt). Nach 5 Wochen wurde beiden Glucoseversuchslösungen die übliche Menge an anorganischem Phosphat zugesetzt. Daraufhin zeigte sich schon nach 2 Tagen eine auffallende Beschleunigung des Gärverlaufs. Vor der

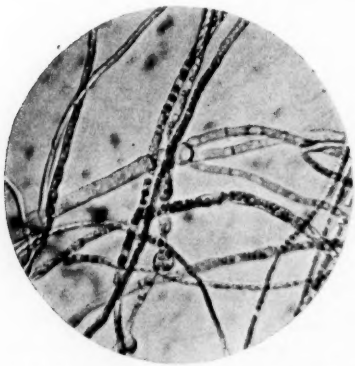


Abb. 2. Morphologische Erneuerung des Mycels in einer 40 Tage alten phosphatarmen Xylose-Nährlösung, 2 Tage nach Zusatz von Phosphat. Gilt auch für Hexose-Nährlösungen. (400 mal Vergr.)

Abb. 2a stellt das alternde Mycel vor Phosphatzugabe dar. (400 mal Vergr.)

Tabelle VI. Reihenversuch mit Xylose.

Versuch 1 und 2 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 3 und 4 bis zum 8. Oktober ohne Phosphatzusatz, am 8. Oktober Nachgabe von anorganischem Phosphat. Impfmaterial: 4 Tage alte Leinsamenkultur.

Datum 1935	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P
2. IX.	—	200	—	200	—		—	
4. IX.	17,6	200	8,8	200	8,8		17,6	
6. IX.	48,4	200	48,4	202	11,0		22,0	
9. IX.	11,0	200	52,8	200	22,0		33,0	
13. IX.	66,0	200	94,6	197,5	48,4		79,2	
18. IX.	81,4	200	70,4	200	44,0		44,0	
24. IX.	77,0	202,5	79,2	200	48,4		46,2	
1. X.	85,8		74,8		57,2		81,4	
8. X.	90,2		55,0		35,2	225	46,2	225
10. X.					26,4	225	19,8	227
12. X.					35,2	227	48,4	225
15. X.	77,0		125,4		132,0	225	61,6	225
17. X.					35,2		24,2	
23. X.	70,4		61,6		46,2		50,6	
31. X.					83,6		79,2	
8. XI.					68,2		52,8	
Summe:	624,8 mg CO_2		671,0 mg CO_2		701,8 mg CO_2		706,2 mg CO_2	
	281,8 „ C_2H_5OH		276,4 „ C_2H_5OH		260,4 „ C_2H_5OH		253,9 „ C_2H_5OH	

Zuführung des anorganischen Phosphats war die Höchstleistung an Kohlensäureentwicklung 12,5 mg am Tage; nach dem Zusetzen des Phosphats stieg sie nach 6 Tagen auf 44,5 mg an. Während des Verlaufs der Vergärung zeigt sich zum Ende der fünfwöchigen Periode eine starke Erschöpfung der Leistungsfähigkeit des flB. Nach der erwähnten Phosphatzugabe jedoch tritt nicht nur eine Erhöhung der biochemischen Leistung in Erscheinung, sondern, wie der photographische Befund ergibt, auch eine sehr deutliche *morphologische Erneuerung*. 2 Tage *nach* der Phosphatzugabe tritt auch Phosphorylierung ein, nachdem schon am ersten Tag ein kräftiges Anwachsen der CO_2-Bildung eingesetzt hatte.

Im Verlauf des Wachstums von flB. lassen sich zwei leicht unterscheidbare Grundformen erkennen, die hier die Bezeichnung „α-Form" und „β-Form" erhalten sollen. Beide Formen treten sowohl bei dem Mycel, als auch bei den Sichelsporen (Conidien) auf.

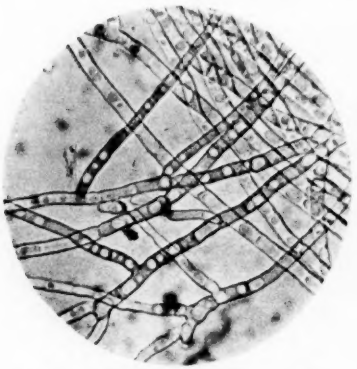


Abb. 3. α-Form aus einer Mannosekultur. (7 Tage alt, 400 mal Vergr.)

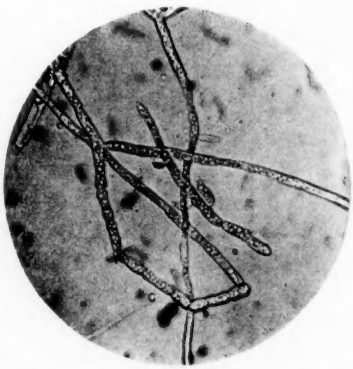


Abb. 4. β-Form aus einer Glucose-Stärkekultur. (4 Wochen alt, 400 mal Vergr.)

Kennzeichen der α-Form: Der Inhalt der Zelle ist gleichmäßig grau und nur an wenigen Stellen ist eine feine Körnung zu erkennen. Große kreisrunde helle Gebilde, wahrscheinlich Vakuolen, die durch die im Verlauf des Stoffwechsels entstandene CO_2 erzeugt werden, sind das auffallendste Zeichen der α-Form. Mit zunehmendem Alter gleichen sich die Vakuolen der Zellform an und drängen schließlich den Plasmainhalt der Zelle auf einen kleinen Raum zusammen.

Kennzeichen der β-Form: Die Körnung, die bei den jungen Zellen nur schwach oder gar nicht vorhanden ist, wird allmählich immer gröber. Sie erscheint im Mikroskop in grünlicher Farbe. Ihrem Verhalten und Aussehen nach handelt es sich bei dieser Körnung vermutlich um kleine Tröpfchen einer fettartigen Substanz. (Eine Ölemulsion in Wasser gibt unter dem Mikroskop dasselbe Bild wie die „Körner", wenn sie etwa durch Reiben aus den Zellen herausgetreten sind.)

Gegen Ende des Wachstums, d. h. nach Verbrauch der vorhandenen Nahrung, sind diese Körner der einzig erkennbare Zellinhalt. Auch die sich dann bildenden Chlamydosporen zeigen als Zellinhalt nur diese Körner, gehören also der β-Form an.

Wie aus dem vorher Gesagten hervorgeht, ist das Auftreten der einen oder der anderen Form von den Nahrungsverhältnissen abhängig.

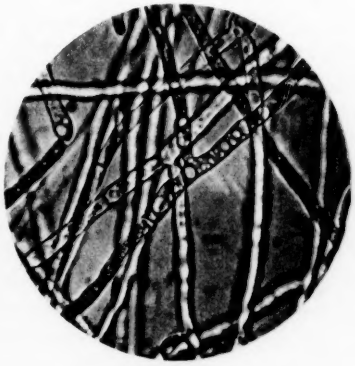


Abb. 5.

Abb. 6.

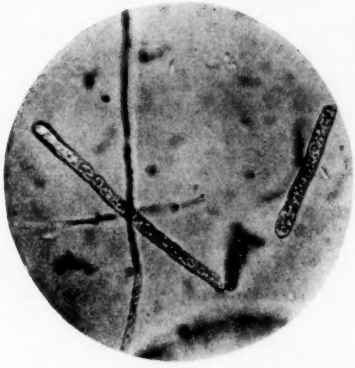


Abb. 7.

Abb. 5, 6 und 7. Wachstumsbilder aus einer Xylosekultur, unter normalen Bedingungen im Alter von 5, 7 und 22 Tagen. (400 mal Vergr.)

In den ersten Tagen nach der Impfung, d. h. bei günstigsten Ernährungsbedingungen, ist die α-Form in sehr reiner Beschaffenheit vorhanden. Wenn nach 2 bis 3 Wochen die Nahrung verbraucht ist, hat die β-Form die α-Form völlig zurückgedrängt. In der Zwischenzeit sind in der Nährlösung sowohl beide Formen nebeneinander, als auch alle möglichen Übergangsformen zu beobachten.

Unter Nahrungsmangel ist hierbei nicht nur das Fehlen von Kohlenhydraten zu verstehen, sondern auch der Mangel von mineralischen Aufbaustoffen verursacht den Übergang zur β-Form, wie die Versuche mit sehr phosphatarmen Lösungen gezeigt haben. Fehlt Phosphat in der Lösung, so tritt schon am zweiten Tag nach der Impfung die β-Form in den Vordergrund und beherrscht während des ganzen sehr langsamen Wachstums das Bild[1]. Darüber hinaus fällt bei Phosphatmangel die geringe Stärke der einzelnen Fäden auf. Diese Erscheinung verliert sich allmählich.

Allerdings ist Nahrungsmangel nicht die einzige Ursache des Auftretens der β-Form; auch die Anhäufung von Stoffwechselerzeugnissen in der Nährlösung scheint zur Ausbildung der β-Form zu führen. Das geht aus folgenden Beobachtungen hervor: Als Kohlenstoffnahrungsquelle können dem flB. an Stelle der Kohlenhydrate auch Alkohole dienen. In einer 0,4%igen Äthylalkoholösung zeigt flB. ein langsames, aber durchaus normales Wachstum, d. h. wie in einer Zuckerlösung tritt auch hier im Anfang die α-Form auf, die dann erst allmählich in die β-Form übergeht. Ist in einer Zuckerlösung nach etwa 2 Wochen der Zucker in CO_2 und Äthylalkohol umgesetzt, kann von einem Nahrungsmangel noch nicht die Rede sein, da doch jetzt in der Lösung Alkohol, sogar annähernd in optimaler Konzentration, als C-Nahrungsquelle vorhanden ist. Trotzdem ist zu diesem Zeitpunkt die α-Form kaum noch in der Lösung zu finden.

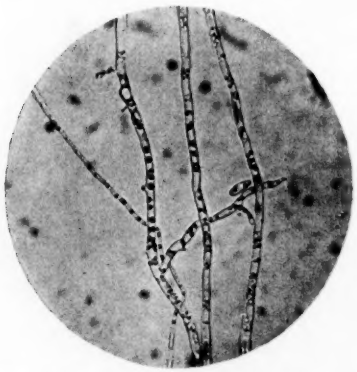


Abb. 8. Merkmale des P-Mangels: frühzeitige Entstehung des β-Mycels und schwächere Fäden. 2 Tage alte Kultur auf Glucose gewachsen. (400 mal Vergr.)

Schließlich kann noch auf eine Beobachtung hingewiesen werden, die gleichfalls zeigt, daß nicht das Fehlen der Nahrung allein, sondern jede Hemmung der Lebensfunktion das Auftreten der β-Form zur Folge hat. In einer stark sauren (p_H zwischen 1,5 und 2) Lösung zeigte flB. ein durchaus anormales Wachstum. Die Bildung der Mycelfäden und der Sichelsporen blieb aus. Der Pilz wuchs in Formen, die

[1] Laut einer persönlichen Mitteilung von Dr. *D. Burk*, Washington, D. C., vom 12. Dezember 1935, sind ähnliche Beobachtungen auch von ihm am *Azotobacter* gemacht und festgehalten worden.

während eines normalen Wachstums nicht auftreten und vielleicht noch am ehesten an die Chlamydosporen (sehr alter Kulturen) erinnern. Der Zellinhalt dieser anormalen Gebilde zeigt ganz rein den β-Typus. Unter normalen Bedingungen keimten übrigens diese entarteten Zellen wieder zu den gewöhnlichen Formen aus.

Die Xyloseversuche unterschieden sich, wie auch die späteren Darlegungen erweisen, von den Hexoseversuchen durch geringere Geschwindigkeit der Vergärung. Ein weitaus wesentlicher Unterschied ergab sich aus der Beobachtung des Phosphorspiegels im Versuch 5 und 6 durch die Feststellung des Ausfalls der Phosphorylierung, eine Beobachtung, die auch im Versuch 3 und 4 *nach* Zugabe von anorganischem Phosphat unverändert blieb. Auch die Xylose zeigt nach Phosphatzugabe das Ansteigen der biochemischen Leistung und die morphologische Erneuerung. Sehr gut läßt sich das Ansteigen der biochemischen Leistung mit Hilfe eines Kohlensäurediagramms veranschaulichen.

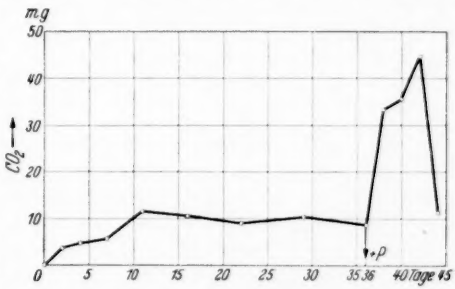


Abb. 9. Durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure bei Vergärung von Glucose ohne P, später mit P. Impfmaterial: Leinsamenkultur.

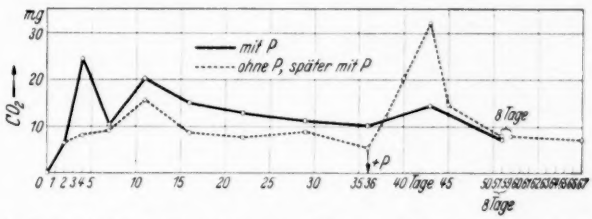


Abb. 10. Durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure bei Vergärung von Xylose. Impfmaterial: Leinsamenkultur.

Außer der d-Xylose wurde auch d-Arabinose zum Beobachten der Pentosenvergärung als Substrat herangezogen. Zum Vergleich werden zwei Xylose-Reihenversuche und zwei Arabinose-Reihenversuche mitgeteilt.

Tabelle VII gibt einen Xyloseversuch begonnen am 21. August wieder. Hier wurde das Impfmaterial für Kolben I, II und V einer 4 Tage alten Leinsamenkultur entnommen, die Substrate von Kolben III und IV wurden mit 150 mg Trockenpräparat vom 8. Januar geimpft.

Tabelle VII. Reihenversuch mit Xylose.

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 ohne Phosphatzusatz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 4 Tage alte Leinsamenkultur. Impfmaterial für Versuch 3 und 4: 150 mg Trockenpräparat vom 8. Januar 1935.

Datum 1935	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5
	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2
21. VIII.	—	200	—	200	—	200	—	200	—
23. VIII.	0	200	2,2	200	0	200	4,4	200	2,2
26. VIII.	88	200	90,2	200	99,0	200	90,2	197,5	19,8
29. VIII.	57,2	198	42,9	196	79,2	197,5	66,0	200	15,4
2. IX.	41,8	200	30,8	200	81,4	200	94,6	202,5	39,6
5. IX.	28,6	200	22,0	200	61,6	200	57,2	200	13,2
11. IX.	61,6	200	59,4	200	105,6	200	118,8	200	33,0
17. IX.	63,8	200	63,8	200	101,2	200	92,4	202,5	39,6
23. IX.	74,8	200	72,6	200	57,2	200	63,8		48,4
26. IX.	33,0		33,0		28,6		24,2		15,4
3. X.	57,2		50,6						35,2
10. X.	37,4		57,2						35,2
15. X.									30,8
23. X.									28,6
31. X.									90,2
8. XI.									28,6
Summe:	543,4 mg CO_2		524,7 mg CO_2		613,8 mg CO_2		611,6 mg CO_2		475,2 mg CO_2
	288,1 mg C_2H_5OH		263,6 mg C_2H_5OH		277,7 mg C_2H_5OH		273,6 mg C_2H_5OH		128,4 mg C_2H_5OH

Tabelle VIII. Reihenversuch mit Arabinose.

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosphatzusatz, am 19. November erhält Versuch 5 anorganischen Phosphatzusatz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 5 Tage alte Leinsamenkultur. Impf

Tabelle VIII. Reihenversuch mit Arabinose.

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosphatzusatz, am 19. November erhält Versuch 5 anorganischen Phosphatzusatz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 5 Tage alte Leinsamenkultur. Impfmaterial für Versuch 3, 4 und 6: 150 mg Trockenpräparat vom 11. November.

Datum 1935	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6
	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2
7. X.	—	225	—	225	—	225	—	225	—		—
9. X.	11,0	217,5	19,8	225	17,6	220	17,6	225	11,0		26,4
11. X.	44,0	225	37,4	230	33,0	225	44,0	225	13,2		48,4
14. X.	160,6	230	136,4	227,5	74,8	225	59,4	225	17,6		48,4
17. X.	30,8	215	44,0	215	48,4	225	59,4	230	22,0		50,6
21. X.	35,2	225	66,0	227,5	72,6	227,5	48,4	227,5	63,8		105,6
24. X.	22,0	230	35,2	227,5	72,6	227,5	92,4	227,5	41,8		57,2
29. X.	44,0	227,5	41,8	227,5	105,6	227,5	103,4	230	72,6		105,6
5. XI.	74,8	225	52,8	230	99,0	230	72,6	230	57,2		99,0
13. XI.	52,8		50,6		101,2				72,6		118,8
19. XI.	39,6		41,8		77,0				55,0	225	
21. XI.									28,6	227,5	
23. XI.									30,8	225	
25. XI.									17,6	225	
27. XI.									24,4	227,5	
29. XI.									17,6	227,5	
2. XII.									24,2	227,5	
5. XII.									17,6		
10. XII.									35,2		
17. XII.									52,8		
24. XII.									44,0		
31. XII.									41,8		
1936											
7. I.									41,8		
14. I.									41,8		
22. I.									28,6		
31. I.									37,4		
7. II.									15,4		
Summe:	514,8 mg CO_2 19,5 mg C_2H_5OH		525,8 mg CO_2 17,5 mg C_2H_5OH		701,8 mg CO_2 62,4 mg C_2H_5OH				936,4 mg CO_2 7,1 mg C_2H_5OH		660,0 mg CO_2 44,2 mg C_2H_5OH

Während die Vergärung in den phosphathaltigen Substraten nach ungefähr 5 Tagen eine Höchstleistung an Kohlensäureerzeugung von 30 mg ergab, erreichte die Vergärung in Kolben V, der wie üblich P-freie Nährlösung enthielt, nur eine Höchstleistung von 10 mg und am 8. November sank schließlich die Kohlensäureerzeugung auf 3,7 mg. Obgleich der Zucker noch nicht verbraucht war, wurde der Versuch abgebrochen. Auch hatte der Gesamtkohlensäurewert noch nicht den theoretischen Wert erreicht, wozu zu bemerken ist, daß aus 1 g Pentose 586,6 mg Kohlensäure und 306,6 mg Alkohol entstehen könnten. Auffallend ist der sehr niedrig gefundene Alkoholwert. Man kann hieraus schließen, daß bei sehr langsamer Vergärung des Kohlenhydrats der Unterschied zwischen Gärgeschwindigkeit und Geschwindigkeit der Dehydrierung bereits beim Einsetzen der Letzteren sich wesentlich verringert.

In einem anderen Reihenversuch mit Xylose, begonnen am 11. Dezember, wurde das Substrat in Kolben I, II und V mit 1 ccm einer Sporenlösung aus der Massenzüchtung vom 5. Dezember und das Substrat der Kolben III, IV und VI mit je 20 mg Trockenpräparat vom 6. November geimpft. Die Kolben V und VI enthielten phosphatfreies Substrat. Die beiden phosphatfreien Substrate zeigten in diesem Falle keine geringere Gärgeschwindigkeit als die phosphathaltigen. Der Versuch lief $5^1/_2$ Woche bis zum Verbrauch des Zuckers in den Kolben III, V und VI.

Die während des Xyloseversuchs vom 12. August gemachten photographischen Aufnahmen zeigen die allmähliche morphologische Veränderung des flB. im Verlauf seines Stoffwechsels (vgl. Abb. 5, 6 und 7).

Zu Tabelle VIII: Im Arabinoseversuch, begonnen am 7. Oktober, erhielt das für Kolben I bis IV benutzte Substrat anorganisches Phosphat zugesetzt, während die Versuchslösung in Kolben V und VI phosphatfrei war. Kolben I, II und V wurden mit je einem Leinsamenkorn mit anhaftendem Mycel aus 5 Tage alter Kultur und Kolben III, IV und VI mit je 150 mg Trockenpräparat vom 11. September geimpft. Wie aus der Tabelle ersichtlich, vergären die Substrate I, II, III, IV und VI mit sich ähnelnder Geschwindigkeit. Die größte Kohlensäureproduktion zeigt das mit Leinsamenkultur geimpfte, anorganisches Phosphat enthaltende Substrat, nämlich eine Tagesleistung nach 7 Tagen von ungefähr 50 mg Kohlensäure. Die Höchstproduktion der übrigen Substrate ging nicht über 20 bis 25 mg Kohlensäure hinaus. Im Gegensatz zu dem mit 150 mg Trockenpräparat geimpften phosphatfreien Substrat ist die Gärgeschwindigkeit des mit Leinsamenkultur geimpften Substrats in Kolben V ganz auffallend klein. Die höchste Tagesleistung liegt nach fast 5 Wochen bei 15 mg Kohlensäure. Durch Zusatz von 900 mg anorganischem Phosphat nach $1^1/_2$ Monaten zeigte sich auch hier wieder ein Anstieg der biochemischen Leistung, wie aus Tabelle VIII (Versuch 5)

Tabelle IX. Reihenversuch mit Arabinose.

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosphatzusatz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 5 Tage alte Leinsamenkultur. Impfmaterial für Versuch 3, 4 und 6: 20 mg Trockenpräparat vom 9. September.

Datum	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	Versuch 6
1935	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg CO_2
23. XI.	—	217,5	—	217,5	—	217,5	—	217,5	—	—
25. XI.	8,8	217,5	13,2	217,5	8,8	217,5	4,4	217,5	13,2	17,6
27. XI.	28,6	208,3	24,4	217,5	26,4	210,0	19,8	212,5	26,4	37,4
29. XI.	33,0	208,3	33,0	210,0			41,8	215,0	37,4	26,4
2. XII.	26,4	208,3	28,6	212,5			33,0	215,0	8,8	26,4
5. XII.	26,4	217,5	50,6	217,5			26,4	212,5	13,2	39,6
10. XII.	46,2	217,5	48,4	217,5			41,8	215,0	33,0	66,0
17. XII.	50,6	220	52,8	217,5			180,4	220,0	90,2	96,8
24. XII.	63,8		44,0				39,6		57,2	79,2
31. XII.	50,6		46,2				41,8		74,8	83,6
1936										
7. I.	41,8		48,4				61,6		72,6	85,8
14. I.	44,0		37,4				37,4		66,0	70,4
22. I.	30,8		37,4				28,6		59,4	68,2
31. I.	37,4		15,4				48,4		72,6	63,8
7. II.	30,8		35,2				37,4		63,8	59,4
Summe:	519,2 mg CO_2		515,0 mg CO_2				642,4 mg CO_2		628,6 mg CO_2	820,4 mg CO_2
	12,8 mg C_2H_5OH		14,9 mg C_2H_5OH				11,5 mg C_2H_5OH		10,1 mg C_2H_5OH	9,8 mg C_2H_5OH

Während die Vergärung in den phosphathaltigen Substraten nach ungefähr 5 Tagen eine Höchstleistung an Kohlensäureerzeugung von 30 mg ergab, erreichte die Vergärung in Kolben V, der wie üblich P-freie Nährlösung enthielt, nur eine Höchstleistung von 10 mg und am 8. November sank schließlich die Kohlensäureerzeugung auf 3,7 mg. Obgleich der Zucker noch nicht verbraucht war, wurde der Versuch abgebrochen. Auch hatte der Gesamtkohlensäurewert noch nicht den theoretischen Wert erreicht, wozu zu bemerken ist, daß aus 1 g Pentose 586,6 mg Kohlensäure und 306,6 mg Alkohol entstehen könnten. Auffallend ist der sehr niedrig gefundene Alkoholwert. Man kann hieraus schließen, daß bei sehr langsamer Vergärung des Kohlenhydrats der Unterschied zwischen Gärgeschwindigkeit und Geschwindigkeit der Dehydrierung bereits beim Einsetzen der Letzteren sich wesentlich verringert.

In einem anderen Reihenversuch mit Xylose, begonnen am 11. Dezember, wurde das Substrat in Kolben I, II und V mit 1 ccm einer Sporenlösung aus der Massenzüchtung vom 5. Dezember und das Substrat der Kolben III, IV und VI mit je 20 mg Trockenpräparat vom 6. November geimpft. Die Kolben V und VI enthielten phosphatfreies Substrat. Die beiden phosphatfreien Substrate zeigten in diesem Falle keine geringere Gärgeschwindigkeit als die phosphathaltigen. Der Versuch lief $5^1/_2$ Woche bis zum Verbrauch des Zuckers in den Kolben III, V und VI.

Die während des Xyloseversuchs vom 12. August gemachten photographischen Aufnahmen zeigen die allmähliche morphologische Veränderung des flB. im Verlauf seines Stoffwechsels (vgl. Abb. 5, 6 und 7).

Zu Tabelle VIII: Im Arabinoseversuch, begonnen am 7. Oktober, erhielt das für Kolben I bis IV benutzte Substrat anorganisches Phosphat zugesetzt, während die Versuchslösung in Kolben V und VI phosphatfrei war. Kolben I, II und V wurden mit je einem Leinsamenkorn mit anhaftendem Mycel aus 5 Tage alter Kultur und Kolben III, IV und VI mit je 150 mg Trockenpräparat vom 11. September geimpft. Wie aus der Tabelle ersichtlich, vergären die Substrate I, II, III, IV und VI mit sich ähnelnder Geschwindigkeit. Die größte Kohlensäureproduktion zeigt das mit Leinsamenkultur geimpfte, anorganisches Phosphat enthaltende Substrat, nämlich eine Tagesleistung nach 7 Tagen von ungefähr 50 mg Kohlensäure. Die Höchstproduktion der übrigen Substrate ging nicht über 20 bis 25 mg Kohlensäure hinaus. Im Gegensatz zu dem mit 150 mg Trockenpräparat geimpften phosphatfreien Substrat ist die Gärgeschwindigkeit des mit Leinsamenkultur geimpften Substrats in Kolben V ganz auffallend klein. Die höchste Tagesleistung liegt nach fast 5 Wochen bei 15 mg Kohlensäure. Durch Zusatz von 900 mg anorganischem Phosphat nach $1^1/_2$ Monaten zeigte sich auch hier wieder ein Anstieg der biochemischen Leistung, wie aus Tabelle VIII (Versuch 5)

Tabelle IX. Reihenversuch mit Arabinose.

Versuch 1 bis 4 mit anorganischem Phosphatzusatz, Versuch 5 und 6 ohne Phosphatzusatz. Impfmaterial für Versuch 1, 2 und 5: 5 Tage alte Leinsamenkultur. Impfmaterial für Versuch 3, 4 und 6: 20 mg Trockenpräparat vom 9. September.

Datum	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	Versuch 6
1935	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg CO_2
23. XI.	—	217,5	—	217,5	—	217,5	—	217,5	—	—
25. XI.	8,8	217,5	13,2	217,5	8,8	217,5	4,4	217,5	13,2	17,6
27. XI.	28,6	208,3	24,4	217,5	26,4	210,0	19,8	212,5	26,4	37,4
29. XI.	33,0	208,3	33,0	210,0			41,8	215,0	37,4	26,4
2. XII.	26,4	208,3	28,6	212,5			33,0	215,0	8,8	26,4
5. XII.	26,4	217,5	50,6	217,5			26,4	212,5	13,2	39,6
10. XII.	46,2	217,5	48,4	217,5			41,8	215,0	33,0	66,0
17. XII.	50,6	220	52,8	217,5			180,4	220,0	90,2	96,8
24. XII.	63,8		44,0				39,6		57,2	79,2
31. XII.	50,6		46,2				41,8		74,8	83,6
1936										
7. I.	41,8		48,4				61,6		72,6	85,8
14. I.	44,0		37,4				37,4		66,0	70,4
22. I.	30,8		37,4				28,6		59,4	68,2
31. I.	37,4		15,4				48,4		72,6	63,8
7. II.	30,8		35,2				37,4		63,8	59,4
Summe:	519,2 mg CO_2		515,0 mg CO_2				642,4 mg CO_2		628,6 mg CO_2	820,4 mg CO_2
	12,8 mg C_2H_5OH		14,9 mg C_2H_5OH				11,5 mg C_2H_5OH		10,1 mg C_2H_5OH	9,8 mg C_2H_5OH

ersichtlich ist. *Der Phosphorspiegel blieb dabei unverändert.* Sämtliche Versuche dieser Reihe wurden abgebrochen bei noch vorhandener starker Zuckerreaktion. Der Versuch 5 wurde als einziger 4 Monate lang laufen gelassen, die Vergärung ging stetig langsam weiter und zeigte bei Anwesenheit von über 900 mg Kohlensäure immer noch Zuckerreaktion. Bei der Bestimmung des Gesamtalkohols ergab sich, daß der größte Teil des Alkohols bereits dehydriert war. Diese Erscheinung war in dem Ausmaße nur bei der Arabinose zu beobachten.

Während in dem eben beschriebenen Versuch die Phosphatasewirkung im Falle der Arabinose als ebenso unsicher anzusehen ist wie in einer von *Euler* und *Kullberg*[1] mitgeteilten Einzelbeobachtung, zeigt der Versuch, der in Tabelle IX aufgezeichnet ist, die Tatsache der Phosphorylierung ganz einwandfrei.

Die Beobachtungen über das Verhalten der Pentosen sind von grundlegender Bedeutung. Im Falle der Xylose konnte festgestellt werden, daß die Vergärung mit Hilfe eines P-frei gemachten Erregers auffallend langsam verläuft, um beim Zusatz von anorganischem P eine Spitzenleistung in der CO_2-Entbindung aufzuweisen *ohne* vorausgehende Phosphorylierung und *ohne* Änderung des P-Spiegels nach dem Zusatz. Mit der Arabinose konnte dagegen zum erstenmal und einwandfrei gezeigt werden, daß sie in Gegenwart von anorganischem P mit Hilfe der Phosphatase des flB. verestert werden kann. Diese Beobachtung gibt uns einen Hinweis auf die selektive Arbeitsleistung der Zelle und den Schlüssel zum Entstehen mancher Naturprodukte. *Sie beweist aber auch gleichzeitig, welche Vorsicht bei der Anwendung von Analogieschlüssen bei biochemischen Prozessen geboten ist, und daß das Bestreben, aus Überschneidungen von Beobachtungen mit Muskel, Hefe und Bakterien auf die Gleichwertigkeit von biologischen Agenzien zu schließen, bisher nicht nur experimentell ungenügend untermauert erscheint, sondern Tatsachen an den Tag fördert, die zum Widersprechen zwingen.*

c) Hexosen.

Es werden noch einige Reihenversuche mit Mannosesubstrat mitgeteilt, und zwar der in Tabelle X (begonnen am 14. September) wiedergegebene Versuch mit P-freier Nährlösung, die Versuche (Abb. 12) mit P-haltiger Nährlösung. Es sollte der Einfluß des angewandten Impfmaterials auf die Vergärung festgestellt werden.

Wie aus der Tabelle X und den dazugehörigen Ergänzungskurven ersichtlich ist, erreichen die mit 150 mg Trockenpräparat geimpften Substrate die höchsten Tagesleistungen an Kohlensäure und den schnellsten Gärverlauf. Das Verhalten der mit Leinsamenkultur ge-

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**, 22, 1911.

Tabelle X. Reihenversuch mit Mannose.

Versuch 1 bis 6 ohne anorganischen Phosphatzusatz. Am 16. Oktober erhält Versuch 1 anorganisches Phosphat zugesetzt. Impfmaterial für Versuch 1 und 2: 5 Tage alte Leinsamenkultur. Impfmaterial für Versuch 3 und 4: 1 ccm Sporenlösung aus der Massenzüchtung vom 30. August. Impfmaterial für Versuch 5 und 6: 150 mg Trockenpräparat vom 20. August.

Datum 1935	Versuch 1		Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
	mg CO_2	mg P	mg CO_2	mg CO_2	mg CO_2	mg CO_2	mg CO_2
14. IX.	—		—	—	—	—	—
16. IX.	15,4		17,6	22,0	37,4	125,4	105,6
17. IX.	11,0		22,0	50,6	48,4	68,2	103,4
18. IX.	6,6		24,2	52,8	52,8	85,8	110,4
19. IX.	18,6		24,2	57,2	59,4	30,8	37,4
21. IX.	19,8		50,6	103,4	96,8	52,8	55,0
24. IX.	22,0		66,0	103,4	83,6	46,2	48,4
27. IX.	15,4		41,8	59,4	50,6	35,5	28,6
30. IX.	22,0		52,8	83,6	63,8		
11. X.	118,8		101,2				
16. X.	43,8	175	59,4				
17. X.	17,6	175					
18. X.	41,8	175					
19. X.	39,6	175					
22. X.	48,4	177,5					
23. X.	88,0	177,5	59,4				
30. X.			74,8				
Summe:	528,8 mg CO_2		594,0 mg CO_2	532,4 mg CO_2	492,8 mg CO_2	444,7 mg CO_2	488,8 mg CO_2
	339,2 mg C_2H_5OH		341,8 mg C_2H_5OH	348,1 mg C_2H_5OH	369,8 mg C_2H_5OH	391,0 mg C_2H_5OH	424,1 mg C_2H_5OH

impften Substrate ist durchschnittlich sehr ähnlich, nur im Mannoseversuch ohne Phosphatzugabe zeigte das mit Leinsamenkultur geimpfte Substrat der Kolben I und II einen besonders langsamen Gärverlauf. Nach einem Monat wurde dem Kolben I 750 mg anorganisches Phosphat zugeführt und, wie aus der Kurve gut ersichtlich, stieg die Kohlensäureproduktion auch in diesem Falle wieder an. Der Phosphorspiegel blieb jedoch unverändert.

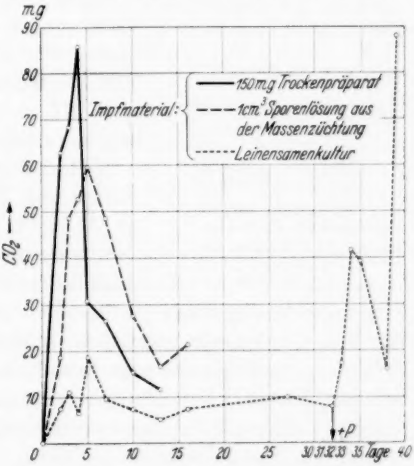


Abb. 11. Durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure bei Vergärung von Mannose ohne P, später mit P.

Es kann angenommen werden, daß die biochemische

Leistungsfähigkeit des Systems, wenn es von Anfang an auf einem kohlenhydrathaltigen, aber P-freien Nährboden wächst und arbeitet, so weitgehend geschwächt wird, daß auch eine nachherige P-Zugabe die Phosphorylierung selbst nicht mehr zu entfachen vermag, obwohl die Vergärung des Zuckers selbst, gemessen an der CO_2-Entbindung, infolge der Zellregeneration wesentlich gesteigert wird. Auch dieser Versuch zeigt, daß eine Gärung mit unbeschädigten Zellen *ohne* vorhergehende oder sogar nachfolgende Phosphorylierung möglich ist.

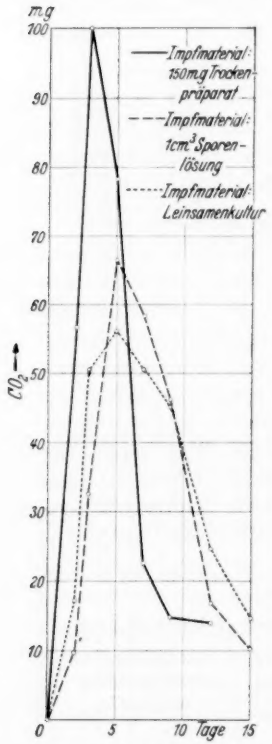


Abb. 12. Durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure bei Vergärung von Mannose mit P.

Im Mannoseversuch, begonnen am 11. November, wurde in Kolben I bis IV phosphathaltiges Substrat, in Kolben V und VI phosphatfreies Substrat benutzt. Kolben I, II und V wurden mit einem Leinsamenkorn mit anhaftendem Mycel aus 3 Tage alter Kultur geimpft, Kolben III, IV und VI mit je 20 mg Trockenpräparat vom 9. September.

Die geringere Menge an Trockenpräparat genügte nicht, um die Vergärung im Vergleich zu der Leinsamenimpfung zu beschleunigen.

Eine langsame Vergärung zeigte einzig der Versuch des Kolbens V, in dem nach 2 Wochen noch nicht die Hälfte des vorhandenen Zuckers vergoren war. Der Versuch wurde abgebrochen, nachdem der Phosphoranfangswert erreicht war.

d) Kontrollen.

Zur Sicherung der bisher gemachten Erfahrungen wurden noch besondere Versuche zur Beobachtung der Veränderung des Phosphorspiegels durchgeführt. In Tabelle XI ist das Ergebnis einer dieser Versuche verzeichnet.

Drei Doppelversuche mit Glucose, Arabinose und Xylose als Substrat wurden mit je 20 mg Trockenpräparat geimpft und zur Kontrolle der Phosphorylierung 12 Tage lang täglich, im Falle der Glucose die erste Bestimmung bereits nach 12 Stunden, eine P-Bestimmung ausgeführt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, bestätigte sich die bisher gemachte Erfahrung, daß Glucose und Arabinose phosphoryliert werden, jedoch bei der Xylose keine Phosphorylierung festgestellt werden konnte. Zugleich mit den P-Bestimmungen wurden jeweils eine p_H-Bestimmung ausgeführt. Die gefundenen p_H-Werte sind neben den P-Werten in der Tabelle aufgeführt. Es zeigt sich, daß die Versuchslösung im Verlauf des Stoffwechsels des flB. allmählich saurer wird.

Tabelle XI. Phosphorbestimmungen und p_H-Bestimmungen an mit 20 mg Trockenpräparat geimpftem Glucose-, Arabinose- und Xylosesubstrat.

Versuch 1 und 2: Glucose als Substrat, Versuch 3 und 4: Arabinose als Substrat, Versuch 5 und 6: Xylose als Substrat.

Datum	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
1935	mg P	p_H	mg P	p_H	mg P	p_H	mg P	p_H	mg P	p_H	mg P	p_H
2. XII.	162,5	4,6	162,5	4,6	195	4,6	195	4,6	195	4,6	195	4,6
2. XII. abends	162,5		162,5									
3. XII.	162,5	4,6	162,5	4,6	195	4,6	195	4,6	195	4,6	197,5	4,6
4. XII.	162,5	4,6	162,5	4,6	195	4,6	195	4,6	197,5	4,6	197,5	4,6
5. XII.	156,2	4,2	155,0	4,2	184	4,8	191,7	4,8	197,5	4,6	200	4,6
6. XII.	159	4,2	160,0	4,2	192,5	4,6	187,5	4,6	200	4,6	200	4,6
7. XII.	156,2	4,0	160,0	4,0	197,5	4,4	185	4,4	200	4,2	200	4,2
8. XII.	162,5	4,0	160,0	4,0	195	4,2	195	4,2	200	4,2	200	4,2
9. XII.	162,5	4,0	165	4,0	192,5	4,2	195	4,2	200	4,2	200	4,2
10. XII.	162,5	4,0	165	4,0								
12. XII.	162,5	4,0	165	4,0	195	4,2	195	4,2	200	4,2	200	4,2
14. XII.					195	4,0	195	4,0	200	4,0	202,5	4,0

Am Glukosesubstrat wurde dann die Beobachtung des P-Spiegels auch mehrere Male innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Impfung vorgenommen. Tabelle XII gibt das Ergebnis dieses Doppelversuchs wieder und zeigt, daß auch in den allerersten Anfängen keine Phosphorylierung stattfindet, obwohl — wie wir früher gesehen haben — bereits am nächsten Tage eine meßbare CO_2-Entbindung erfolgt.

Tabelle XII. Doppelversuch mit Glucose.

Phosphorspiegel innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Impfung mit 20 mg Trockenpräparat.

Zeit	Versuch 1 mg P	Versuch 2 mg P	Zeit	Versuch 1 mg P	Versuch 2 mg P
$^1/_2$11^h	175	175	$^1/_2$6^h	175	175
$^1/_2$1	175	175	$^1/_2$8	175	175
$^1/_2$4	177,5	175	12	175	175

Soweit also der Genauigkeit der von uns, wie von einer großen Zahl von Forschern angewandten Methode keine unmeßbare Menge des durch die Veresterung gebundenen P sich der Bestimmung entzogen hat, folgt auch aus dem vorstehend mitgeteilten Versuch eindeutig, daß der Vergärung der Zucker keine Phosphorylierung vorangeht.

Da sich aus den zuerst angestellten Reihenversuchen (vgl. Tabelle II bis IV) ergab, daß bereits die Anwesenheit von 12,5 mg anorganischen Phosphats genügten, um ein normales Gären hervorzurufen, wurde noch der Versuch gemacht, die untere Grenze des Phosphatgehalts festzustellen, die nötig ist, um ein normales Wachstum zu erzielen. Zu diesem

Zweck wurde flB. auf Xylose- und Glucosesubstrat mit verschiedenem Phosphatgehalt 6 Tage lang wachsen gelassen und dann die gebildeten Myceldecken gewogen. Es ergab sich, daß bereits 3 mg Phosphat (auf 50 ccm Lösung) genügten, um die Gewichtsmenge an Mycel zu erhalten, die auch bei Zusatz von 100 mg Phosphat nicht überschritten wurde.

Der Phosphatgehalt — darunter die dazugehörigen Mycelgewichte — in den Kolben betrug von links nach rechts in den Glucose enthaltenden Kolben:

100	50	20	3	1	0,5	0 mg Phosphat pro 100 ccm Nährlös.
127,8	104,2	117,8	113,5	60,1	40,8	28,0 „ Mycel.

In den Xylose enthaltenden Kolben:

25	3	1	0,5	0	mg Phosphat pro 50 ccm Nährlösung.
49,6	39,0	37,6	29,4	9,6	„ Mycel.

e) Dehydrierung von Alkoholen.

Um einen weiteren Einblick in die Leistungsfähigkeit des Enzymsystems des flB. zu gewinnen, wurde es auf einer Nährlösung wachsen gelassen, die 0,4 % Äthylalkohol enthielt. Auch bei Verwendung von Alkohol als C-Quelle bestätigte sich die Erfahrung, daß bei P-Nachgabe in die Nährlösung ein weitaus kräftigeres Wachstum zu erzielen ist.

Um die Kinetik der Dehydrierung des Äthylalkohols zu verfolgen, wurden Versuche mit folgender Nährlösung angestellt:

50 ccm Wasser
0,01 g Asparagin
0,04 g $MgSO_4 . 7 H_2O$
0,2 g KH_2PO_4

Nach dem Sterilisieren wurden 0,2 g Alkohol (abs.) hinzugefügt.

Tabelle XIII.

Doppelversuch mit Äthylalkohol als Substrat.

Kohlensäurebestimmungen.

Datum (geimpft am 6. I.)	Versuch 1 mg CO_2	Versuch 2 mg CO_2
8. I.	6,6	8,8
10. I.	44,0	30,8
12. I.	41,8	39,6
14. I.	33,0	33,0
18. I.	59,4	61,6
25. I.	35,2	35,2
1. II.	15,4	15,4
8. II.	6,6	8,8
Summe:	242,0 mg CO_2	233,2 mg CO_2

Tabelle XIII gibt die Kohlensäurewerte an verschiedenen Tagen wieder, und es zeigt sich, daß die höchste Tagesleistung an Kohlensäure bei 20 mg liegt, also ähnlich wie bei einer Pentosenvergärung ohne P-Zugabe und Leinsamenkulturimpfung.

Eine Frage von besonderem Interesse ist, ob es einmal gelingen wird,

natürliche, hochpolymere Verbindungen zu synthetisieren und zu finden, wie die Natur diese Stoffe selbst herstellt. Allgemein verlaufen Polymerisationen in zwei Hauptrichtungen, das eine Mal unter Ringbildung, das andere Mal unter Bildung von langen Ketten. Für die biologischen Reaktionen sind Grenzflächenvorgänge besonders wichtig, weil hier die Moleküle in bestimmter Orientierung reagieren können und so ein kettenförmiger Aufbau in bestimmter Aneinanderreihung leichter erfolgen kann.

Eine Verbindung zu dieser Überlegung stellt der Versuch dar, den biochemischen Abbau dieser Substanzen zu studieren, zumal ein etwaiger Erfolg auf diesem Wege auch einen Fingerzeig zur Erkennung des physikalischen Aufbaues bzw. der strukturchemischen Stelle des enzymatischen Angriffs liefern kann.

Zu diesem Zwecke haben wir den Versuch unternommen, den Polyvinylalkohol, dem eine Zwischenstellung zwischen Zucker und Stärke zugewiesen[1] und die Struktur einer Ketose[2] zugeschrieben wird, der Wirkung der Dehydrasen des flB. auszusetzen.

Es wurden Versuche mit folgender Nährlösung ausgeführt:

50	ccm Wasser
0,01 g	Asparagin
0,04 g	$MgSO_4 . 7 H_2O$
200 mg	KH_2PO_4
250 „	Polyvinylalkohol

Geimpft wurde mit 50 mg Trockenpräparat. Abb. 13 gibt ein Bild vom Verlauf der Dehydrierung des Polyvinylalkohols während 25 Tagen. Das von uns verwendete Präparat, das einen Polymerisationsgrad von etwa 300 besaß und etwa 2% Natriumsulfat enthielt, konnte von dem Erreger glatt dehydriert werden bei einer höchsten Tagesleistung von 12,5 mg Kohlensäure. Dieser Vorgang stellt einen typischen Fall einer enzymatischen Kohlenstoffkettenverkürzung dar. Bemerkenswerterweise verläuft die Dehydrierung des Polyvinylalkohols, wie auch die des Äthylalkohols, über die *Essigsäurestufe*, die im Verlauf der Reaktion jederzeit nachgewiesen werden konnte[3].

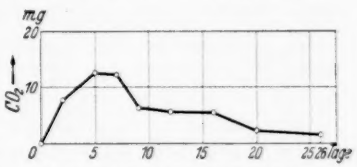


Abb. 13. Durchschnittliche Tagesleistung an Kohlensäure bei Dehydrierung von Polyvinylalkohol.

Ergebnisse und Zusammenfassung.

Seit der Entdeckung der Zymophosphate im Verlauf einer Hefenzellsaftgärung wurde mit mehr oder weniger Entschiedenheit angenommen, daß die Dissimilation der Kohlenhydrate im lebenden Organismus allgemein erst dann erfolgen kann, wenn die Zucker durch enzymatische Entstehung der dazugehörigen Phosphorsäureester bzw. der Hydrolyse der entstandenen Zuckerester eine nachfolgende, vermeintliche Auflockerung ihres Moleküls erfahren haben. Den bisherigen

[1] *W. O. Herrmann* u. *W. Haehnel*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **60**, 1658, 1927. — [2] *A. G. Ruschtschinski*, Chem. Centralbl. **1933**, I, S. 2323. — [3] Auf diese Versuche soll noch später näher eingegangen werden.

Stand unserer Erkenntnisse in dieser Frage stellen die Befunde von *Euler* und *Adler*[1] bzw. *Parnas* und Mitarbeitern[2] dar, in welchen sowohl der Umesterung der Adenosintriphosphorsäure, sowie der Veresterung von freiem anorganischen Phosphat in der lebenden Zelle eine ausschlaggebende Rolle zugeschrieben wird, zumal in der Hefe sowohl Adenylsäure als auch Adenosintriphosphorsäure nebeneinander vorhanden sind.

Aus den eben erwähnten Mitteilungen geht jedoch nicht eindeutig hervor, ob der Dissimilation eines Kohlenhydrats in der lebenden Zelle unter allen Umständen eine bzw. welche von den voneinander trennbaren verschiedenartigen Übertragungen der Phosphatgruppe durch Enzyme vorangehen *muß*. Jedenfalls sind keine Versuche von den Autoren mitgeteilt, aus welchen geschlossen werden konnte, ob sie es z. B. unternommen haben, festzustellen, wie sich eine nach *Wieland* und *Wille* (l. c.) durch Schütteln mit Sauerstoff an Reservestoffen verarmte Hefe, bzw. aus einer solchen gewonnene Präparate und Säfte hinsichtlich Veresterung verhalten würden.

Die von uns unter Heranziehung des Enzymsystems des weitverbreiteten flB. durchgeführten Versuche haben sowohl mit lebenden Zellen, als auch bei Anwendung von Trockenpräparaten einwandfrei ergeben, daß der Vergärung eines Kohlenhydrats (sowohl Hexosen als auch Pentosen) eine Veresterung von freiem anorganischen Phosphat nicht voranzugehen braucht, sondern, daß die Auflockerung des Zuckermoleküls im Sinne der Terminologie der Gegenwart, wahrscheinlich durch ein Spreizen oder Deformieren der Bindungen der Substratmoleküle durch die Adsorptionskräfte der Enzymoberflächen vorangeht, wodurch eine Molekülkonstruktion zustande kommt, die als vergärbare Zuckerform, „Transportform"[3] bezeichnet und eingehend erörtert wurde. Einer ähnlichen Vorstellung hat sich übrigens später bei Betrachtungen über die Entstehung von Bernsteinsäure bei der enzymatischen Oxydation von Essigsäure auch *Wieland*[4] bedient.

Wenn eine *einleitende* Zymophosphatbildung durch anorganisches Phosphat hier (wie bei der Hefe) in Frage käme, so müßte sie in der Zelle in praktisch verschwindend kleiner Zeit verlaufen. Es war aber bereits bekannt und ist hier erneut vor Augen geführt worden, daß nicht nur die Bildung der Hexosephosphate, sondern der Abbruch dieser Moleküle ebenfalls eine meßbare Zeit in Anspruch nimmt.

Die Veresterung *kann* aber im späteren Verlauf der Reaktion eintreten und trotz der Phosphatasewirkung festgehalten werden. Daß

---

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **235**, 122, 1935. — [2] Diese Zeitschr. **281**, 168, 1935. — [3] *F. F. Nord*, Science **65**, 474, 1927; Ergebn. d. Enzymforschung **1**, 94, 1932; vgl. auch *K. Wetzel*, Ergebn. d. Biol. **10**, 323, 1934. — [4] Helv. chim. Acta **15**, 521, 1932.

die Phosphorylierung im Falle der Kohlenhydratdissimilation durch flB. keine zwangsläufig einleitende Reaktion darstellt, konnten wir auf drei voneinander unabhängigen Wegen nachweisen:

1. Die durchgehende Prüfung der mitgeteilten Versuchsprotokolle zeigt eindeutig, daß der Schwund an anorganischem Phosphor durchschnittlich 2 bis 5 Tage *nach* dem Einsetzen der Gärung und *nach* dem Fassen der sich entbindenden Kohlensäure beginnt.

2. Abgesehen von der wichtigen Beobachtung, daß mit dem Enzymsystem des flB. sowohl d-Xylose als auch d-Arabinose vergoren werden können, hat es sich gezeigt, daß im Falle der Xylose überhaupt keine Phosphorylierung eintritt.

3. Züchtet man den Erreger auf mit Wasser gequollenem Leinsamen und setzt der Nährlösung kein anorganisches Phosphat zu, so hat sich unter den beschriebenen Versuchsbedingungen und mit Hilfe der von uns angewandten Methoden bei Heranziehung von d-Mannose bzw. d-Xylose und d-Arabinose gezeigt, daß die Gärleistung des Systems in Abwesenheit von anorganischem Phosphat (über die Anwesenheit von zelleigenen Phosphordonatoren können wir zur Zeit nichts aussagen) wesentlich herabgesetzt wird, um sich später aber nach erfolgter Nachgabe von anorganischem Phosphor durchweg bis zur Höhe der normalen Kohlensäuretagesleistung zu erhöhen, *ohne* daß auch nur eine Spur einer meßbaren Phosphorylierung festzustellen gewesen wäre. Dagegen ging mit der Regeneration der Gärfähigkeit eine sichtbare morphologische Veränderung der Zellen vor sich, die darauf schließen läßt, daß der Phosphor für den Zellneubau bzw. die Pufferung der Zelle von Bedeutung ist.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß flB. ein Zellsystem darstellt, das sowohl lebend als auch in Form von Trockenpräparaten nicht nur fähig ist, Alkohole zu dehydrieren, sondern sowohl Hexosen als auch Pentosen in einer den stöchiometrischen Verhältnissen mit der Hefengärung übereinstimmenden Weise abzubauen, *ohne* daß dieser Vorgang durch eine Veresterung mit anorganischem Phosphat in der lebenden Zelle eingeleitet wird, jedoch später von ihr begleitet werden *kann*.

Über die Messung des p_H im Blute mit Hilfe der Glaselektrode.

Von

G. Haugaard und **Erling Lundsteen.**

(Aus dem Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 12. März 1936.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Die Messung des p_H im Vollblut war früher ziemlich umständlich, aber nach dem Erscheinen der Glaselektrode, deren Schöpfer *Haber* und *Klemensiewicz* (1) (1909) waren, der jedoch erst *P. M. T. Kerridge* (2) (3) (1925) und vor allem *Mac Innes* und *Malcolm Dole* (4) (1930) durch Benutzung einer geeigneten Glassorte eine anwendbare Form gaben, besitzen wir nun eine sowohl bequeme als zuverlässige Methode zur Messung des p_H im Blute. Die Glaselektrode ist denn auch in jüngster Zeit von mehreren Forschern zur Messung des p_H des Blutes unter verschiedenen physiologischen Verhältnissen benutzt worden und man müßte heute bei derartigen Messungen eigentlich immer die Glaselektrode verwenden; man stößt aber immer noch auf Arbeiten, denen die älteren, wohlbekannten Methoden zugrunde liegen.

Wir glauben, daß bisher eine passende Methodik für diese Messungen gefehlt hat, und haben uns daher die Aufgabe gestellt, ein Verfahren zur Messung des p_H im Vollblut, sowohl im Venenblut als im Kapillarblut, auszuarbeiten. Wenn auch die beschriebene Methode auf einige einfache physiologische Experimente angewandt ist, so liegt doch das Schwergewicht dieser Arbeit in der Beschreibung des Verfahrens der Blutentnahme und der Messung des p_H.

A. Messung des p_H im Venenblut.

Bei der Messung des p_H-Wertes einer Flüssigkeit, die wie das Blut Kohlensäure enthält, muß man eine Abgabe von CO_2 während der Messung verhindern, indem man das Blut auf irgendeine Weise einschließt. Dies läßt sich, wie *Kerridge* (2) es getan hat, dadurch erreichen, daß man die Oberfläche des Blutes mit einer Schicht Paraffinöl zudeckt, wie das auch bei kolorimetrischen Messungen des p_H des Blutes bekannt ist. Da es indessen unangenehm ist, mit Paraffinöl zu arbeiten, haben wir es vorgezogen, die Abgabe von CO_2 dadurch zu verhindern, daß wir das Blut in einen Raum schlossen, den es fast ganz anfüllte.

Abb. 1 stellt ein von uns zur Messung des p_H von Venenblut benutztes Elektrodengefäß dar, das aus einem kleinen, mit einer Seitenröhre *a* versehenen Glaszylinder besteht. Das eine Ende des Glaszylinders ist mit dem Mündungsteil einer Rekordspritze verschlossen, das andere mit einem

Gummistöpsel, durch den eine Glaselektrode *b* hindurchgeführt ist. Die Seitenröhre ist ebenfalls mit einem Gummistöpsel verschlossen, durch welchen eine mit einem Hahn versehene Röhre hindurchgeführt ist. Die Elektrode ist mit einer Pufferlösung gefüllt; wir wählten die Citratlösung von *S. P. L. Sörensen*. Das obere Ende der Elektrode steht durch einen kurzen Gummischlauch mit einer h-förmigen Röhre in Verbindung, deren oberer Teil mit einem kleinen Gummiballon versehen ist; dieser dient dazu, die Citratlösung aufzusaugen, so daß die ganze Röhre angefüllt ist, und die Flüssigkeit aus dem Heber *c* zu entfernen, falls eine Vermischung mit einer anderen Flüssigkeit zu befürchten ist.

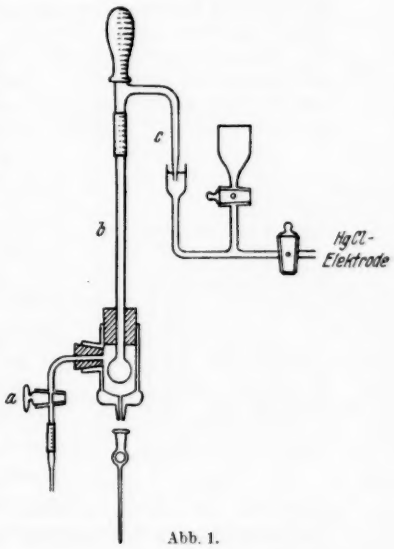


Abb. 1.

Die Messung geschieht nun auf folgende Weise: Eine Kanüle wird in die Armvene hineingeführt, und wenn das Blut zu strömen beginnt, wird das Elektrodengefäß mit der Kanüle verbunden und in einer solchen Stellung festgehalten, daß die Luft durch die Seitenröhre, deren Hahn offen steht, hinausgepreßt wird; es ist von Wichtigkeit, daß die Seitenröhre keine Wassertropfen enthält, da die Kapillarwirkung sonst dem Entweichen der Luft Widerstand leistet. Wenn der zylindrische Teil des Gefäßes drei Viertel voll ist, beginnt das Blut durch die Seitenröhre zu laufen; das Blut, das zuerst hinausströmt, ist auch zuerst ins Elektrodengefäß geströmt und hat möglicherweise CO_2 abgegeben. Wenn einige Tropfen Blut herausgeströmt sind, dreht man den Hahn zu, und das Elektrodengefäß kann nun nach Entfernung der Kanüle in einen Luftthermostaten von 37° gebracht werden, wo es sich mit der Elektrode auch vor der Messung befand. (Wenn das Elektrodengefäß während der Blutentnahme aus dem Thermostaten herausgenommen ist, kann man es vor Wärmeverlust schützen, indem man es mit der Hand umschließt.) Die Elektrode wird nun so an einem Gestell angebracht, daß die Seitenröhre *a* in ein Schälchen mit 3,5 n KCl-Lösung eintaucht, worin sich auch die Heberröhre einer Kalomelelektrode befindet. Die h-förmige Röhre der Glaselektrode taucht in die Citratlösung, die — wie die Abbildung zeigt — durch eine mit einem Hahn versehene Röhre mit einer Kalomelelektrode in Verbindung steht. Die beschriebene Vorrichtung ermöglicht es, eine Änderung der Zusammensetzung der Innenflüssigkeit sowohl der Glaselektrode als der Kalomel-

elektrode zu verhüten, selbst wenn die Flüssigkeitsverbindungen schon lange Zeit bestanden haben.

H. Yoshimura (5) mißt das p_H des Blutes nach einem ähnlichen Verfahren.

Auf Abb. 2 ist die Elektrode von *Yoshimura* dargestellt. *b* ist der wirksame Teil des Elektrodengefäßes, das bei *a* mit einem Gummischlauch, dessen freies Ende zugebunden ist, verschlossen ist. Durch den Gummischlauch kann man eine Kanülenspitze stecken, an der eine Rekordspritze sitzt, womit das Venenblut abgezapft wurde. Auch hier läßt sich das Blut so einführen, daß das zuerst eingeführte Blut auch zuerst ausströmt. Nachdem die Elektrode mit Blut gefüllt ist, wird sie in ein mit einer Pufferlösung gefülltes Gefäß gebracht. Da die *Yoshimura*sche Elektrode mit dem Elektrodengefäß eine Einheit ausmacht, lange, enge Röhren besitzt und deshalb wahrscheinlich schwer zu reinigen ist, haben wir die von uns beschriebene Elektrodenanordnung, die in einzelnen Punkten der von *B. S. Platt* und *S. Dickinson* (6) benutzten ähnelt, vorgezogen.

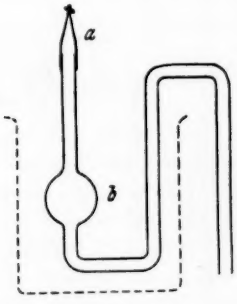


Abb. 2.

Bekanntlich findet in stehendem Blut Glykolyse statt, wodurch das Blut saurer wird. Um den Einfluß hiervon auf den gemessenen p_H-Wert zu untersuchen, wurde zu festgesetzten Zeitpunkten innerhalb einer Stunde p_H und Zuckergehalt[1] einer Blutprobe gemessen. Die Blutprobe wurde in zwei Teile geteilt, von welchen einer zu p_H-Bestimmungen und der zweite zu Blutzuckerbestimmungen benutzt wurde. Letzterer Anteil wurde in einen Wasserthermostaten von 37° gestellt, und es wurden davon in abgelesenen Zeitpunkten Proben für die Zuckerbestimmung genommen, die nach der Methode von *H. C. Hagedorn* und *B. Norman Jensen* (7) behandelt wurden. Um die Ge-

Tabelle I. Experimentell ermittelte Werte für p_H und Blutzuckergehalt einer Probe von Venenblut als Funktion der Zeit nach der Entnahme.

Min.	p_H	Blutzucker mg-%	Min.	p_H	Blutzucker mg-%	Min.	p_H	Blutzucker mg-%	Min.	p_H	Blutzucker mg-%
1	7,404	108	5	7,391		12	7,385		35	7,364	
1½	7,393		6	7,391	101	13	7,380		40	7,359	88
2	7,391		7	7,393		14	7,387		45	7,351	
2½	7,395		8	7,388		15	7,391		47	7,346	
3	7,396		9	7,378		20	7,380	97	50	7,339	88
4	7,396		10	7,391	103	25	7,367	97	55	7,333	
4¼		100	11	7,380		30	7,372	93	60	7,326	83

[1] Bei orientierenden Vorversuchen hat uns das „Finsen-Laboratorium" die Gefälligkeit erwiesen, die Zuckeranalysen vorzunehmen; wir sprechen dem Institut hierfür unseren besten Dank aus.

rinnung zu verhindern, wurde etwas Heparin in ungelöster Form zugesetzt.

Die p_H-Messungen und die Zuckerbestimmungen sind in Tabelle I angeführt und in Abb. 3 graphisch dargestellt.

In der Tabelle sind die p_H-Werte mit drei Dezimalstellen angegeben. Nun läßt sich das p_H wohl kaum mit größerer Genauigkeit als 0,01 bis 0,02 Einheiten messen, wenn man aber wie hier mit derselben Aufstellung eine Reihe aufeinanderfolgender p_H-Werte derselben Flüssigkeit mißt, ist die dritte Dezimalstelle mit Hinblick auf die Vergleichung der gemessenen p_H-Werte unter sich sicher berechtigt. Um eine bessere Übersicht über die Meßergebnisse zu gewinnen, sind in Tabelle II einige graphisch ausgeglichene Werte für den p_H und die Zuckerbestimmungen zusammengestellt.

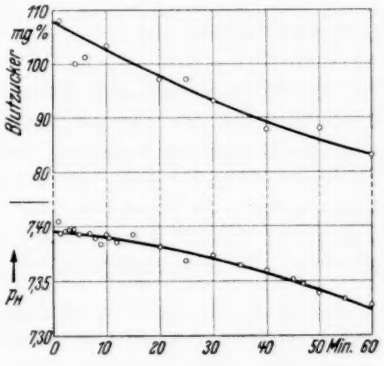


Abb. 3.

Wie man aus Tabelle II ersieht, beträgt die Verschiebung des p_H im Laufe der ersten 10 Minuten 0,006 Einh., das ist im Verhältnis zu der Genauigkeit, mit der sich der p_H einer Blutprobe bestimmen läßt, schon viel, und *man muß daher darauf achten, daß bei den gegebenen Versuchsbedingungen die Messung im Laufe von etwa 5 Minuten zu beenden ist*, da die Veränderung des p_H in diesem Zeitraum infolge der Glykolyse nur eine geringe ist. Die im folgenden mitgeteilten Versuche wurden, sofern nicht andere Angaben gemacht werden, innerhalb dieses Zeitraumes ausgeführt.

Tabelle II. Graphisch ausgeglichene Werte für p_H und Blutzuckergehalt als Funktion der Zeit.

Min.	p_H	Blutzucker mg-%	Min.	p_H	Blutzucker mg-%	Min.	p_H	Blutzucker mg-%
0	7,396	108,0	25	7,376	95,1	45	7,350	87,4
5	7,393	105,1	30	7,370	92,9	50	7,342	85,9
10	7,390	102,6	35	7,363	91,0	55	7,333	84,3
15	7,386	100,2	40	7,356	89,1	60	7,323	83,0
20	7,382	97,8						

Es wäre denkbar, daß die Heparinzuführung das p_H des Blutes verändern könnte, dies ist aber — wie von *Hisato Yoshimura* (8) nachgewiesen — nicht der Fall. *Yoshimura* verbindet serienweise zwei Elektroden, von denen eine mit Blut ohne Zusatz von Heparin und die zweite mit Blut mit

beigegebenem Heparin gefüllt ist. In einem Versuch war 9 ccm Blut 1 ccm 0,5 %iges Heparin (in physiologischer Kochsalzlösung) zugeführt, in einem zweiten derselben Menge Blut 1 ccm 1 %ige Heparinlösung; die Heparinkonzentration in den Blutproben betrug also 0,05 bzw. 0,1 %. Bei beiden Versuchen wurde ein Unterschied im p_H der beiden Lösungen von 0,005 Einheiten festgestellt, ein Unterschied, der sicher innerhalb der Fehlergrenze liegt. Wir benutzten bei unseren Messungen etwa 0,001 g Heparin zu 1 g Blut, und eine p_H-Änderung infolge der Heparinzuführung kann daher kaum stattgefunden haben.

Der oben beschriebene Versuch wurde dreimal wiederholt, das eine Mal ohne Zusatz von Heparin. Die Versuchsergebnisse waren in allen Fällen, sowohl was die p_H-Messungen als die Zuckerbestimmungen betrifft, übereinstimmend, und wenn wir auch den Milchsäuregehalt nicht direkt gemessen haben, so kann doch darüber kein Zweifel bestehen, daß die p_H-Verschiebung in saurer Richtung den durch die Glykolyse gebildeten Säuren zuzuschreiben ist.

Die im vorhergehenden beschriebene Elektrode wurde darauf bei folgenden, einfachen physiologischen Versuchen angewandt. Das p_H von Venenblut wurde gemessen, nachdem die Versuchsperson sich eine Zeitlang vor dem Versuch in Ruhe befunden hatte und darauf 2 Minuten lang eine intensive Arbeit (Lauf auf der Stelle) ausführte. Unmittelbar, d. h. etwa 5 Minuten nach Aufhören der Arbeit wurde das p_H des Blutes gemessen. Die Messungsergebnisse sind in Tabelle III verzeichnet.

Tabelle III.

Zeit		π	p_H
12h30′	8 ccm prim. Phosphat + 2 ccm sek. Phosphat	24,8	6,21
12 45	5 „ „ „ + 5 „ „ „	57,3	6,78
1 00	8 „ „ „ + 2 „ „ „	24,8	6,21
1 15	2 „ „ „ + 8 „ „ „	89,9	7,35
1 50	*Blut ohne vorhergehende Arbeit*	*91,3*	*7,37*
2 00	*Blut nach 2 Min. Laufen auf der Stelle* . . .	*77,1*	*7,13*
2 30	5 ccm prim. Phosphat + 5 ccm sek. Phosphat	57,3	6,78
3 40	*Blut nach 1 Std. 40 Min. Ruhe*	*90,2*	*7,35*
4 10	*Blut nach Stase von 3 Min.*	*90,8*	*7,36*
4 20	8 ccm prim. Phosphat + 2 ccm sek. Phosphat	24,7	6,21
4 30	5 „ „ „ + 5 „ „ „	56,7	6,78
4 40	2 „ „ „ + 8 „ „ „	89,7	7,35

Die Verschiebung im p_H während der Arbeit von 7,37 bis 7,13, also 0,24 p_H-Einh., entspricht sehr gut den Ergebnissen anderer Autoren: z. B. stellt *Edwin P. Laug* (9) in einem Versuch, wo sechs Versuchspersonen 440 Yards in etwa 1 Minute liefen (eine Leistung, die schätzungsweise ungefähr der unserigen entspricht), p_H-Verschiebungen fest, die 1 bis 4 Minuten nach beendetem Laufen zwischen 0,17 und 0,40 p_H-Einh. liegen. Die Verschiebung im p_H scheint etwa 5 Minuten nach dem Lauf am größten zu sein. Diesen Sachverhalt kennt man übrigens schon

lange. In einer Abhandlung aus dem Jahre 1916 zeigt *K. A. Hasselbalch* (10) durch Nachrechnung von Versuchen, die von *Christiansen*, *Douglas* und *Haldane* (11) angestellt wurden, daß das p_H des Blutes nach Ausführung intensiver Arbeit um etwa 0,1 Einh. fällt.

In Tabelle III sind auch die Potentiale einiger Pufferlösungen nebst den entsprechenden p_H-Werten aufgeführt. Als Pufferlösungen dienten die von *S. P. L. Sörensen* angegebenen Phosphatmischungen. Die angegebenen p_H-Werte sind die von *S. P. L. Sörensen* (12) bei 18° bestimmten, minus einer Korrektur von 0,030. Diese Korrektur entspricht dem Unterschied in den Messungstemperaturen (37° in unserem Falle) und ist berechnet auf der Grundlage der von *A. B. Hastings* und *J. Sendroy, Jr.* (13) bei 20 und 38° ausgeführten Messungen.

Wie aus der Tabelle III erhellt, findet man bei Messung der Pufferlösungen vor und nach der Messung des p_H des Blutes dieselben Potentiale. Die Zahlen sind aufgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Potentiale zu zeigen. Das p_H des Blutes ist berechnet nach der Formel

$$p_{H_{Blut}} - p_{H_{Puffer}} = \frac{\pi_{Blut} - \pi_{Puffer}}{58},$$

wobei die Potentiale in Millivolt gemessen sind. Falls die Potentialfunktion der Elektrode der *Nernst*schen Formel genau folgte, müßte bei der Meßtemperatur 37° der Faktor durch den Wert 61,5 ersetzt werden, wie aber *G. Haugaard* (14) in einer früheren Arbeit nachgewiesen hat, folgen die Kugelelektroden nicht ganz der *Nernst*schen Formel, ein Umstand, den neuerdings *Hisato Yoshimura* [(5) S. 338] auch erwiesen hat, und den übrigens auch mehrere andere Forscher festgestellt haben, jedoch ohne ihn deutlich auszusprechen. In einer folgenden Arbeit wird diese Frage eingehender erörtert werden.

Unseres Wissens gibt es in der Literatur keine direkt bestimmte Titrationskurve für Venenblut; einer derartigen Kurve müßte wahrscheinlich große Bedeutung beigemessen werden, indem sie in Verbindung mit anderen Bestimmungen (Hämoglobingehalt, Partialdruck des Sauerstoffs, aktuellem p_H des Blutes usw.) zur Charakterisierung der genommenen Blutprobe beitragen würde. Deshalb haben wir mit Hilfe der Glaselektrode und eines speziellen Elektrodengefäßes einige Titrationskurven des Venenblutes verschiedener Versuchspersonen gemessen.

Bei der natürlichen Reaktion des Blutes — p_H 7,37 — ist, wie später nachgewiesen werden wird, die Kohlensäure beinahe vollständig in Bicarbonationen und Wasserstoffionen dissoziiert. Um außerhalb des Dissoziationsgebietes des Bicarbonats zu bleiben, sind wir von der natürlichen Reaktion des Blutes ausgegangen und haben Base zugeführt.

D. A. Mac Innes und *Donald Belcher* (15) bestimmten kürzlich den p_K, der Kohlensäure aufs neue und ermittelten für Flüssigkeiten mit

derselben Ionenstärke wie das Blut den Wert 6,30. Legen wir diesen Wert zugrunde, so finden wir, daß bei p_H 7,30 das Verhältnis zwischen dem HCO_3-Ion und der nichtdissoziierten Kohlensäure (den CO_2-Gehalt eingeschlossen) 10 ist, bei p_H 7,40 12,6 und bei p_H 7,50 15,9 usw. Unter diesen Umständen halten wir es für berechtigt, die Kohlensäure schon bei Beginn der Titration als vollständig in Wasserstoffionen und Bicarbonationen dissoziiert aufzufassen, und wenn deshalb der Gesamtgehalt an Kohlensäure während der ganzen Dauer des Versuchs konstant bleibt, können wir damit rechnen, daß die beigegebene Menge von Natriumhydroxyd tatsächlich die Änderung im Basengehalt darstellt.

Abb. 4 zeigt das bei diesen Versuchen benutzte Gefäß. Das Gefäß besitzt an der Seite eine kleine Öffnung *a*, die mit einem Stückchen Gummischlauch verschlossen ist; die untere, mit einer Ausblasevorrichtung versehene Röhre ist mit einer 0,1 %igen Natriumchloridlösung, der 1 % Agar beigegeben ist, gefüllt. Die kleine Ausblasevorrichtung soll die erstarrte Natriumchloridlösung daran hindern, aus der Röhre herauszutreten, wenn im Elektrodengefäß Überdruck entsteht. Durch den Agarzusatz soll verhindert werden, daß sich das Blut mit der Flüssigkeit in der Röhre vermischt, wodurch die Titrierung verdorben werden könnte. Eine Mischung durch Diffusion ist ohne Bedeutung, da die ganze Messung nur 10 bis 12 Minuten beansprucht. Das Füllen der Elektrode geht nun so vor sich, daß man die Kanülenspitze, an die eine gewogene, mit Blut gefüllte Rekordspritze befestigt ist, durch das Loch *a* der Glaswand steckt und die Spritze entleert; die Spritze wird darauf wieder gewogen. Während der Füllung des Elektrodengefäßes muß der Hahn am oberen Rohr offen stehen. Man läßt ein wenig Luft im Elektrodengefäß zurück, um später der Natriumhydroxydlösung Raum zu verschaffen; es muß jedoch beständig ein wenig Luft da sein, so daß man durch wiederholtes Wenden des Elektrodengefäßes umrühren kann. Nach der Füllung wird der Hahn zugedreht, und nachdem das Elektrodengefäß in dem Luftthermostaten angebracht ist, kann man nun den p_H messen. Die Messung wird wiederholt nach Zuführung von n/10 NaOH mit einer vorher gewogenen Spritze. Nach Zuführung der Base wird die Spritze wieder gewogen, und dies wiederholt sich nach jeder Zuführung. Es ist von Wichtigkeit, daß die Kanülenspitzen nicht zu grob sind, da das Gummihäutchen nach Entfernung der Kanüle sonst nicht ganz schließt; der Gummischlauch darf auch nicht zu stark gespannt sein.

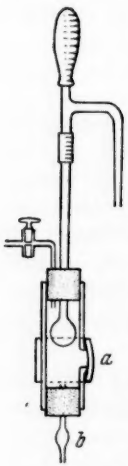


Abb. 4.

Zu den Titrationsversuchen wurden etwa 3,5 g Blut benutzt, und die zugeführte Natriumhydroxydmenge betrug jedesmal etwa 0,2 g. Letztere ist umgerechnet in Milligrammäquivalente pro 100 g Blut.

Die Ergebnisse der Titrationsversuche sind in Tabelle IV aufgeführt: es werden vier derartige Versuche mitgeteilt. Die Buchstaben der ersten Horizontalrubrik sind die Anfangsbuchstaben der Versuchspersonen. Graphisch dargestellt finden sich die Resultate in Abb. 5, und er-

wartungsgemäß hat die Titrationskurve in diesem verhältnismäßig schmalen p_H-Intervall einen linearen Verlauf. Das Aussehen der Kurven deutet darauf hin, daß man nach jeder Zuführung von Base tatsächlich Gleichgewicht im System gehabt hat. Zu betonen ist, daß wir das p_H des *Blutplasmas* messen, und daß man sich die Möglichkeit denken

Tabelle IV. Titrierung von Vollblut.

S. O. 8. I. 1936		B. 8. I. 1936		V. J. 14. I. 1936		L. 14. I. 1936	
mg Äquiv. NaOH pro 100 g Blut	p_H	mg Äquiv. NaOH pro 100 g Blut	p_H	mg Äquiv. NaOH pro 100 g Blut	p_H	mg Äquiv. NaOH pro 100 g Blut	p_H
	7,400		7,400		7,400		7,400
0,634	7,647	0,566	7,600	0,508	7,646	0,528	7,571
1,101	7,830	1,112	7,770	1,016	7,867	1,023	7,762
1,625	8,073			1,516	8,126		

Um den Vergleich zu erleichtern, wurden in dieser Tabelle die direkt gemessenen (zwischen 7,37 und 7,39 gelegenen) p_H-Werte des reinen Blutes stets als 7,400 angegeben und die p_H-Werte der verschiedenen Titrationskurvenpunkte entsprechend korrigiert.

könnte, daß die Auswechslung von Ionen zwischen den Blutkörperchen und dem Blutplasma nach Zuführung der Base nicht vor Abschluß der Messung des p_H beendigt wäre. Hierzu ist zu bemerken, daß wir nach Zuführung von Natriumhydroxydlösung das Gefäß sorgfältig mehrere Male wenden, und daß wir bei jeder Messung dies zwei- bis dreimal wiederholt haben, ohne daß sich das Potential änderte. Hätte kein Gleichgewicht geherrscht, so müßte dies durch große Änderungen des Potentials zu Anfang des Versuchs zutage getreten sein, es sei denn, daß die Auswechslung mit enormer Langsamkeit vor sich gehe, was aber ganz unwahrscheinlich ist. *Wir können also mit ziemlicher Sicherheit feststellen, daß die auf Abb. 5 dargestellten Kurven tatsächlich Titrationskurven für Venenblut sind.*

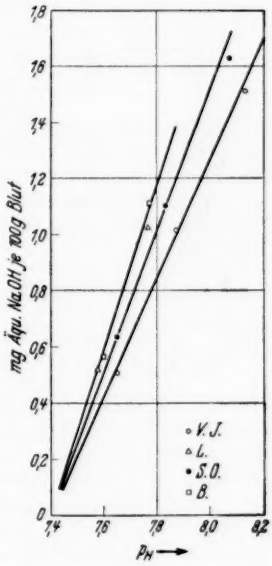


Abb. 5.

Wie oben erwähnt, haben die Verfasser in der Literatur keine Titrationskurven für Vollblut angetroffen; man kann jedoch in mehreren Fällen aus den Angaben des Kohlensäuregehalts und der gemessenen p_H-Werte auf die Änderungen der Carbonationenkonzentration schließen,

und man findet dann ähnliche Werte für die Änderung des p_H durch Säuren- oder Basenzuführung wie die von uns ermittelten. Eine einzelne direkte Angabe haben wir jedoch vorgefunden. So geben *N. W. Shock* und *A. B. Hastings* (16) den Wert von dB/dp_H auf 25 an, wobei dB in Millimol pro Liter Blut angegeben ist. Wir finden für die mittelste Kurve 25,4, wenn wir die zugeführte Basenmenge pro Liter statt pro 100 g Blut angeben, für die oberste Kurve einen etwas größeren Wert, und zwar 29,8, und für die unterste 21,6, also Werte derselben Größenordnung.

B. Messung des p_H von Kapillarblut.

C. Lundsgaard und *E. Möller* (17) haben nachgewiesen, daß Kapillarblut aus den Fingerspitzen etwa denselben Sauerstoffgehalt wie Arterienblut besitzt, und *Samuel Goldschmidt* und *Arthur B. Light* (18) haben sogar gezeigt, daß das Blut der Venen im Handrücken denselben Sauerstoff- und Kohlensäuregehalt wie das Arterienblut hat, wenn die Hand 10 bis 15 Minuten lang in Wasser von 45° Wärme getaucht war; man wird deshalb annehmen können, daß eine Messung des p_H von Kapillarblut unter passenden Verhältnissen dasselbe Interesse beanspruchen darf wie eine Messung des p_H im weit schwieriger zugänglichen Arterienblut.

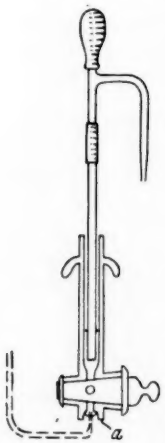


Abb. 6.

Die Messung des p_H von Kapillarblut stößt auf zwei Schwierigkeiten: die Blutentnahme und die Messung an sich. Die Verfasser haben diese Schwierigkeiten durch folgendes Verfahren zu überwinden versucht:

Es wird Kapillarblut aus den Fingerspitzen benutzt. Bevor die Probe genommen wird, taucht die Hand 5 Min. in Wasser von 46°, worauf ein Finger mit einem *Franckeschen* Messer angeschnitten wird. Dann wird das auf Abb. 6 dargestellte Elektrodengefäß über der Wunde angebracht.

Dem Elektrodengefäß wird am unteren plangeschliffenen Rande *a* Leukoplast[1] aufgeschmiert, und es wird während der Probenahme so ins Gleichgewicht gebracht, daß auf den Finger kein Druck ausgeübt wird; dies ist durch die in Abb. 7 gezeigte Aufstellung ermöglicht.

Durch wiederholtes distales Abstreichen des Fingers unter ziemlich starkem Druck läßt sich nun das Elektrodengefäß leicht mit Blut füllen; dazu genügen 0,2 bis 0,3 ccm. Die zuerst hineingeströmte Blutmenge befindet sich obenan in der Elektrode und steht mit der Außenluft in Ver-

[1] Die dem bekannten Leukoplastheftpflaster ansitzende klebrige Masse. Sie läßt sich mit Hilfe von Benzin entfernen und kann darauf leicht dem Rande des Elektrodengefäßes aufgeschmiert werden. Vor der Benutzung muß das Elektrodengefäß eine halbe Stunde in Ruhe stehen, bis das Benzin verdampft ist.

bindung; es erfolgt hier sicher eine Abgabe von Kohlensäure; da aber die Flüssigkeitsoberfläche gering ist, und da der Zwischenraum zwischen der Wand des Elektrodengefäßes und der der Elektrode nur schmal ist, so wird dieser Umstand, da der wirksame Teil der Elektrode tiefer in der Blutflüssigkeit steckt, gar nicht oder kaum einen Einfluß auf die Messung gewinnen können, wenn dieselbe unmittelbar nach der Füllung des Elektrodengefäßes stattfindet. Bei der Messung ist eine Kalomelelektrode,

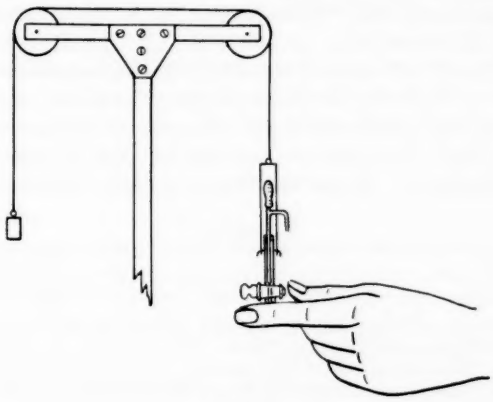


Abb. 7.

deren Heber in ein besonders gebogenes Rohr endigt, mit dem unteren Teil des Elektrodengefäßes verbunden (auf der Abbildung getüpfelt). Die Glaselektrode wird auf die früher beschriebene Weise mit der anderen Kalomelelektrode verbunden. Um einen Überblick über die erzielbare Genauigkeit der Messungen zu gewinnen, wurden fünf aufeinanderfolgende Messungen von Blut derselben Person vorgenommen (Tabelle V).

Tabelle V. p_H-Messungen von Kapillarblut, unmittelbar aufeinanderfolgend; Blut derselben Person.

Messung Nr.		π	p_H
1	Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}351$)	129,4	7,351
2	Kapillarblut	129,8	7,356
3	„	130,0	7,359
4	„	130,1	7,360
5	„	127,2	7,314
6	„	129,5	7,351
7	Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}351$)	129,5	7,351

Bis auf eine Ausnahme stimmen die Messungen gut überein. Warum diese eine Messung abweicht, ist nicht leicht zu entscheiden; es können hier wie stets bei elektrometrischen Messungen dann und wann „Hahnpotentiale" u. ä. auftreten, und möglicherweise war die Blutentnahme

nicht befriedigend. Wir haben bei diesem Versuch eine Planelektrode benutzt, da *kleine* Kugelelektroden meistens eine Elektrodenfunktion haben, die von der *Nernst*schen Formel erheblich abweicht.

Mit derselben Aufstellung haben wir den Versuch wiederholt, indem wir das p_H von Blut vor und nach der Ausführung einer Arbeit (Lauf auf der Stelle, 2 Minuten lang) maßen. Die Resultate, die sich natürlich völlig mit den entsprechenden für Venenblut decken, sind in Tabelle VI aufgeführt.

Wir haben ferner einige Messungen gemacht, bei welchen die p_H-Verschiebung in alkalischer Richtung erfolgte, indem das p_H von Kapillarblut vor und nach 10 Minuten langer Hyperventilation gemessen wurde; hierdurch wurde eine p_H-Verschiebung in alkalischer Richtung von 0,16 hervorgerufen. Die Meßergebnisse enthält Tabelle VII.

Tabelle VI.

Zeit		π	p_H
2h30′	2 ccm prim. Phosphat + 8 ccm sek. Phosphat	124,5	7,35
2 50	*Kapillarblut (Ruhe)*	*125,0*	*7,36*
3 00	*Kapillarblut nach 2 Min. Laufen auf der Stelle*	*115,0*	*7,19*
3 15	2 ccm prim. Phosphat + 8 ccm sek. Phosphat	124,4	7,35
4 00	*Kapillarblut nach 1 Std. Ruhe*	*124,8*	*7,36*
4 20	2 ccm prim. Phosphat + 8 ccm sek. Phosphat	124,1	7,35

Tabelle VII. Hyperventilation.

Kapillarblut	π	p_H
2 ccm prim. + 8 ccm sek. Phosphatlösung	144,0	7,35
Blut vor Hyperventilation	*144,1*	*7,35*
Blut nach 10 Min. Lüftung	*155,4*	*7,51*
2 ccm prim. + 8 ccm sek. Phosphatpuffer	144,1	7,35

Schließlich teilen wir noch einige Messungen des p_H von Venenblut und Kapillarblut derselben Person mit. Die Messungen erweisen, was übrigens schon durch frühere Versuche bekannt ist, daß das p_H des Blutes unter normalen Verhältnissen nur kleinen Schwankungen unterworfen ist.

Tabelle VIII. p_H von Blut derselben Person während eines längeren Zeitraumes. Keine vorhergehende Arbeit vor der Entnahme der Blutprobe.

Datum 1935	p_H	Bemerkung	Datum 1935	p_H	Bemerkung
23. I.	7,37	Venenblut	29. X.	7,35	Venenblut
2. VII.	7,37	„	4. XI.	7,34	„
9. X.	7,36	Kapillarblut	5. XI.	7,36	Kapillarblut
19. X.	7,33	Venenblut			

Es ist den Verfassern ein Bedürfnis, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. *S. P. L. Sörensen* für gute Ratschläge und das Interesse zu danken, welches er diesen Versuchen, die wir bei späterer Gelegenheit gern vertiefen möchten, erwiesen hat.

Zusammenfassung.

Die Verfasser haben einige Methoden zur Messung des p_H von Venenblut und Kapillarblut ausgearbeitet. Es wurde nachgewiesen, daß beim Stehenlassen das Blut saurer wird und daß der Blutzuckergehalt gleichzeitig fällt. Mißt man das p_H des Blutes innerhalb etwa 5 Minuten nach der Blutentnahme, so kann diese p_H-Verschiebung gewöhnlich vernachlässigt werden. Die Verschiebung des p_H von Blut bei einfachen physiologischen Versuchen wurde bestimmt, und schließlich haben die Verfasser einen Abschnitt der Säure- und Basentitrationskurve gemessen.

Literatur.

1) *Haber* u. *Klemensiewicz*, Zeitschr. f. physik. Chem. **67**, 385, 1909. — 2) *P. M. T. Kerridge*, Biochem. J. **19**, 612, 1925. — 3) *Derselbe*, J. of Scient. Instr. **3**, 404, 1926. — 4) *Mac Innes* u. *Malcolm Dole*, J. Amer. Chem. Soc. **52**, 29, 1930. — 5) *Hisatu Yoshimura*, J. of Biochem. (Tokio) **21**, 337, 1935. — 6) *Benjamin Stanley Platt* u. *Sylvia Dickinson*, Biochem. J. **27**, 1069, 1933. — 7) *H. E. Hagedorn* u. *B. Norman Jensen*, diese Zeitschr. **135**, 46, 1923. — 8) *Hisatu Yoshimura*, J. of Biochem. (Tokio) **22**, 285, 1935. — 9) *Edwin P. Laug*, Amer. J. of Physiol. **107**, 689, 1934. — 10) *K. A. Hasselbalch*, diese Zeitschr. **78**, 127, 1916. — 11) *Christiansen*, *Douglas* u. *Haldane*, J. of Phys. **48**, 1914. — 12) *S. P. L. Sörensen*, C. r. Lab. Carlsberg **8**, 376, 1909. — 13) *A. B. Hastings* u. *J. Sendroy, Jr.*, J. of biol. Chem. **61**, 706, 1924. — 14) *G. Haugaard*, C. r. Lab. Carlsberg **19**, Nr. 9, 1934; diese Zeitschr. **274**, 231, 1934. — 15) *D. A. Mac Innes* u. *Donald Belcher*, J. of Amer. Chem. Soc. **57**, 1684, 1935. — 16) *N. W. Shock* u. *A. B. Hastings*, J. of biol. Chem. **112**, 247, 1935. — 17) *C. Lundsgaard* u. *E. Möller*, J. Exp. Med. **36**, 559, 1922. — 18) *Samuel Goldschmidt* u. *Arthur B. Light*, J. of biol. Chem. **64**, 53, 1925.

Über freie und gebundene Amylase in der Gerste.

Von

Karl Myrbäck und **Signe Myrbäck.**

(Aus dem Biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 16. März 1936.)

In ausgezeichneten älteren, mehrmals bestätigten Arbeiten (1) wurde gezeigt, daß in ungekeimter Gerste (sowie in anderen Getreidearten) nur ein Teil der wirklich vorhandenen Amylasemenge ohne weiteres zur Wirkung kommt, während eine bedeutend größere Wirkung nach gewissen Vorbehandlungen des Mehles erzielt werden kann. Als solche Vorbehandlung war eigentlich nur die Behandlung des Mehles mit Proteasenpräparaten (aus leicht einzusehenden Gründen vor allem Papain) dienlich. Ohne Zuhilfenahme komplizierterer Vorstellungen konnten solche Versuche so gedeutet werden, daß ein Teil der Amylase der Gerste frei und löslich ist, ein anderer Teil dagegen so an Eiweißstoffe der Gerste gebunden, daß sie wasserunlöslich und inaktiv ist. Bei der Behandlung des Mehles mit Papain usw. wird das bindende Eiweiß gespalten, die Amylase wird frei und aktiv. Selbstverständlich konnte zuerst die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die Gesamtmenge der Amylase schon von Anfang an löslich und aktiv ist, daß aber bei der Proteolyse aktivierende Stoffe freigesetzt oder gebildet werden. Daß Amylaseaktivatoren existieren (z. B. in Gerstenmalz), steht ja außer Zweifel; die sogenannte Amylokinase wurde z. B. durch *Waldschmidt-Leitz* nachgewiesen (2). Nimmt man an, daß die Vergrößerung der Amylasewirkung durch die Papainbehandlung durch Abbau eines die Amylase bindenden Eiweißes erfolgt, so ist anzunehmen, daß die „Amylasebildung" während der Keimung der Gerste wenigstens zum Teil in der durch die gleichzeitig in Wirkung tretenden eigenen Proteasen der Gerste bedingten Freimachung der gebundenen Amylase besteht. Nun ist ja aber, besonders durch die Untersuchungen von *E. Ohlson* und Mitarbeitern (3), gezeigt worden, daß das Gerstenmalz zwei Amylasen (α-Amylase = Dextrinogenamylase und β-Amylase = Saccharogenamylase) enthält, die ungekeimte Gerste dagegen nur β-Amylase, höchstens neben Spuren von α-Amylase. Von der β-Amylase sollte also nach dem Obigen ein Teil frei, ein anderer an Eiweiß gebunden sein. Die α-Amylase muß also entweder während der Keimung entstehen, oder sie existiert schon in der Gerste, entbehrt aber da einen notwendigen Aktivator, der während der Keimung gebildet wird. Fest steht jedenfalls, daß durch Papainbehandlung der Gerste keine nennenswerte

α-Amylasewirkung hervorgerufen werden kann, so daß der hypothetische Aktivator also nicht ohne weiteres durch Proteolyse des Gerstenеiweißes gebildet oder freigesetzt wird.

Bei Untersuchungen über den Enzymgehalt schwedischer Braugerste reiner Sorten haben wir während der letzten 8 Jahre reichlich Gelegenheit gehabt, diese und andere Fragen über die Amylase der Gerste und des Malzes zu studieren [meist in schwedischen Zeitschriften veröffentlicht (4)]. Dabei sind wir u. a. zu der Überzeugung gekommen (5), daß die β-Amylase der ungekeimten Gerste teils in freier, teils in gebundener, inaktiver Form vorkommt, und daß die Vergrößerung der Amylasewirkung durch Behandlung des Gerstenmehles mit proteasehaltigen Präparaten erklärt werden muß:

1. als eine Wirkung der Proteinasen, die durch keine anderen Stoffe ersetzt werden können,
2. als eine durch Eiweißabbau bedingte Freisetzung gebundener, inaktiver Amylase, also nicht als Freisetzung bzw. Bildung eines Aktivators der schon vorhandenen Amylase.

In einer Reihe von interessanten Arbeiten haben sich *Chrzaszcz* und Mitarbeiter (6) mit den Amylasen der Getreidearten beschäftigt und sind besonders in einer Arbeit (7) auf die oben erwähnten Fragen eingegangen. Sie vergleichen in dieser Arbeit die Wirkung verschiedener Proteasenpräparate auf die Vermehrung der Amylasewirkung der Mehle mit dem durch dieselben Proteasenpräparate hervorgerufenen Abbau des Getreideeiweißes. Aus dem Umstand, daß keine Parallelität zwischen Eiweißabbau und Vergrößerung der Amylasewirkung existiert, schließen die Verfasser, „daß es sich in allen diesen Fällen um eine Steigerung des Wirkungseffektes schon vorhandener Amylase handelt, und daß dies vermutlich dadurch stattfindet, daß Faktoren, die diese Wirkung ermöglichen oder erwecken, gebildet bzw. freigelegt werden". Die Verfasser bezeichnen die Ansicht, daß eine Proportionalität zwischen Abbaugrad des Eiweißes und Zunahme der Amylasewirkung existieren sollte, als „herrschend", was kaum zutreffen dürfte. Auch wenn man annimmt, daß die Zunahme der Amylasewirkung ausschließlich auf der Freisetzung an Eiweiß gebundener Amylase durch das Papain beruht, braucht dies ja gar nicht zu bedeuten, daß die Zunahme der Amylasewirkung der totalen proteolytischen Spaltung des Getreideeiweißes proportional sein muß. Erstens ist es ja gar nicht sicher, daß in einem gewissen Getreidemehl gebundene Amylase überhaupt vorkommt, und wenn die gebundene Amylase schon freigelegt ist, kann ja der Eiweißabbau noch lange Zeit weitergehen. Es ist kaum anzunehmen, daß die „gebundene" Amylase gleichmäßig über alles spaltbare Eiweiß des Getreides verteilt sein sollte oder gar, daß bei der Spaltung allen Eiweißes

des Mehles Amylase freigesetzt werden sollte. Vielmehr ist wohl anzunehmen, daß in der Gerste usw. die inaktive Amylase an ganz spezifische, unlösliche Eiweißstoffe gebunden ist, deren Spaltung bei der Bestimmung der Proteasenwirkung mengenmäßig vielleicht gar nicht in Betracht kommt. Es ist wohl sogar möglich, anzunehmen, daß die Bindung des Enzyms an dem spezifischen Eiweiß durch eine einzige Peptidbindung vermittelt wird, deren Lösung durch eine Proteinase zum aktiven Enzym führt. Andererseits kann es wohl wahrscheinlicher sein, daß die Bindung des Enzyms an Eiweiß dadurch gelöst wird, daß das Eiweiß selbst proteolytisch gespalten wird. Alle bekannten Untersuchungen sind weiter mit der Annahme im Einklang, daß die Vergrößerung der Amylasewirkung durch die Wirkung von *Proteinasen* (und nicht etwa Peptidasen) zustande kommt. Deshalb kann eine Proportionalität zwischen Vermehrung der Amylase und Totalabbau des Eiweißes bei solchen Proteasepräparaten nicht erwartet werden, die aus Mischungen von proteolytischen Enzymen bestehen. Vorliegende Mitteilung soll beitragen zur Beantwortung der Fragen, ob die Vergrößerung der Amylasewirkung ungekeimter Gerste durch Behandlung mit gewissen Präparaten ausschließlich auf der Wirkung darin vorkommender Proteasen beruht (was ja schon als höchst wahrscheinlich betrachten werden muß), und vor allem, ob dabei gebundene Amylase freigesetzt wird, oder etwa Aktivatoren, die die Wirkung der schon vorhandenen Amylase vergrößern.

Alle Amylasebestimmungen wurden in folgender Weise ausgeführt: Amylaselösung bzw. Aufschwemmung fester Präparate in 5 ccm wird zu 45 ccm 1,1 %iger Lösung von *Lintner*-Stärke gesetzt, die etwa 0,05 mol. Phosphatpuffer von $p_H = 5{,}3$ enthält. Temperatur 30°. In Proben von 5 ccm wird nach passenden Zeiten Maltose nach *Willstätter-Schudel* bestimmt. Die Zeiten werden so gewählt, daß bei drei bis vier Bestimmungen die Stärkespaltung kleiner als 30 % ist, so daß hier die Maltosewerte der Zeit direkt proportional sind. Aus den Bestimmungen wird die Maltosebildung in mg pro Minute als Mittel ausgerechnet und direkt als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit verwendet. Man vermeidet bei dieser Berechnungsweise z. B. die Schwierigkeiten, die bei der Anwendung der monomolekularen Formel dadurch entstehen, daß als Wert von „a" in der Formel eine Zahl (= etwa 70 % der Stärkemenge) eingeführt werden soll, die erstens besonders bestimmt werden muß und zweitens sowohl mit dem Enzympräparat wie mit der Stärkesorte erheblich variiert.

Zuerst sei angeführt, daß in unseren ausgedehnten Versuchen eine Wirkung, die mit der des Papains vergleichbar ist, ausschließlich bei typischen Proteasepräparaten beobachtet wurde. Im Gegensatz zu Angaben von anderer Seite fanden wir also z. B. hitzeinaktivierte Papainlösung, Lösungen von Pepton, Aminosäuren usw. völlig wirkungslos, d. h. mit solchen Lösungen wurde genau soviel Amylase freigesetzt wie durch Wasser allein.

Beispiel: 0,5 g Gerstenmehl, 10 ccm Lösung, Toluol. Einwirkung 20 Stunden bei 30°. Amylasebestimmung in 5 ccm Filtrat:

Mit Wasser allein	15,0	mg	Maltose	pro	Minute
„ 2 % *Witte*-Pepton	14,3	„	„	„	„
„ 2 % Glykokoll	15,5	„	„	„	„
„ 3 % inaktivierter Papainlösung	15,2	„	„	„	„
„ 3 % aktiver Papainlösung	42,0	„	„	„	„

Ähnliche Versuche sind mehrmals wiederholt worden auch mit anderen Substanzen und unter Anwendung von Gerste verschiedener Sorten und Ernten. Nur mit proteolytischen Enzymen erhielten wir positive Resultate. Es erübrigt sich hier, Zahlen anzuführen, da diese Seite der Frage schon in anderen Arbeiten besonders in der unter (7) zitierten von *Chrzaszcz* und *Janicki* ausreichend beleuchtet wurde.

Selbstverständlich wollen wir nicht behaupten, daß unter allen Umständen keine anderen Stoffe als Proteasen eine Wirkung auf die Freisetzung der Amylase in der Gerste haben können. Hat nämlich ein Stoff eine Wirkung auf die eigenen proteolytischen Enzyme der Gerste, so wird er auch eine Wirkung auf die Freisetzung der Amylase haben. Als Beispiel wollen wir einige Versuche mit Cyanwasserstoff anführen, die auch sonst von Interesse sein können.

Zu jedem Versuch 0,5 g Gerstenmehl + 10 ccm Lösung + Toluol. 48 Stunden bei 30°. 5 ccm Filtrat untersucht:

Wasser	19,3	mg	Maltose	pro	Minute
+ 0,3 % HCN	27,0	„	„	„	„
+ 1 % Papain	34,4	„	„	„	„
+ 1 % Papain + 0,3 % HCN	36,2	„	„	„	„

Die Wirkung des Cyanwasserstoffes ist also sehr deutlich und auch ein Beweis dafür, daß die Aktivierung der Amylase eine Wirkung der Proteinasen ist.

Bei den von uns untersuchten Gerstenproben war die Menge *löslicher* Amylase immer beinahe gleich der Menge *aktiver* Amylase, was besonders hervorzuheben ist. Untersucht man also eine Suspension von fein geriebenem Mehl, so findet man also dieselbe oder eine nur unwesentlich größere Wirkung, als wenn man das Filtrat derselben Suspension untersucht. Beim Reiben eines Gerstenmehles mit Quarzsand und Puffer (oder Wasser) steigt zuerst die Amylasewirkung der Suspension ein wenig, bleibt aber dann konstant, was ein Beweis dafür ist, daß alle überhaupt aktive Amylase zur Wirkung gekommen ist. In solchen fein geriebenen Suspensionen befindet sich auch beinahe alle Amylase in Lösung. Läßt man eine solche Suspension unter Toluol autolysieren oder behandelt man sie mit Papain, so findet man im allgemeinen, daß die Amylasewirkung des Filtrats zu einem Maximalwert zunimmt, um dann lange konstant zu bleiben [vgl. Tabelle II und Abbildung in der unter (5) zitierten Arbeit]. In diesen Fällen hat also das Papain auf die

Amylase keinen schädlichen Einfluß. Es gibt aber (auch bei Gerste) Fälle, wo bei längerer Papainbehandlung eine deutliche Abnahme der Amylasewirkung beobachtet werden kann, ähnlich wie *Chrzaszcz* und *Janicki* bei anderen Getreidearten gefunden haben. Bei Gersten gewisser Ernten fanden wir, daß besonders in Proben des halbentwickelten Grünmalzes eine beträchtliche Zerstörung der Amylase durch Papain eintrat.

Beispiel. Viertägiges Grünmalz mit Puffer gerieben, dann mit 1%iger Papainlösung bei 30° behandelt:

Amylasegehalt,	sofort bestimmt = freie Amylase	11,6
„	nach 20 Stunden mit Papain	13,2
„	„ 44 „ „ „	12,6
„	„ 76 „ „ „	7,6

Auch in solchen Fällen war aber das Verhalten der ungekeimten Gerste gegen dasselbe Papainpräparat völlig normal. Die oft beobachtete Zerstörung der Amylase durch lange Papainbehandlung ist selbstverständlich kein Beweis gegen die Auffassung, daß die „normale" Papainwirkung in einer Freimachung gebundener Amylase besteht. Daß Enzyme durch Proteasen inaktiviert werden (durch Spaltung des eiweißartigen „Trägers"), ist oft beobachtet worden, und daß eine solche Spaltung bei gewissen Proben von Getreide eintritt, bei anderen nicht, dürfte wohl am einfachsten so gedeutet werden, daß der „Träger" in diesen Fällen nicht der gleiche ist. Daß sich der Träger eines Enzyms in Pflanzensamen sogar bei der Keimung stark verändern kann, davon haben wir ja in der Ricinuslipase ein ausgezeichnetes Beispiel (8).

Oben war nur von der verzuckernden Wirkung der Amylase die Rede. Es sei nochmals hervorgehoben, daß wir immer in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Chrzaszcz* und anderen gefunden haben, daß die Wirkung der α-Amylase (die übrigens in den meisten Gerstenproben beinahe Null ist) durch die Papainbehandlung kaum vergrößert wird. In dieser Beziehung ist die Papainbehandlung keine „künstliche Keimung". Weiter ist zu betonen, daß die durch Papainbehandlung gewonnenen Gerstenamylaselösungen keine größere Ausbeute an Maltose aus einer gewissen Menge Stärke geben als Amylaselösungen, die durch kurze Wasserextraktion aus demselben Gerstenmehl dargestellt sind. Beispiel:

	% Maltose			% Maltose	
	Wasserextrakt	„Papainextrakt"		Wasserextrakt	„Papainextrakt"
4 Min.	16,2	24,8	160 Min.	59,0	—
12 „	42,8	50,0	1440 „	61,6	59,2
20 „	53,6	56,4	2820 „	61,6	61,6

Da Malz aus derselben Gerste eine Verzuckerung von mehr als 80 % der Stärke bewirkt, ergibt sich, daß auch in dieser Beziehung die Papainbehandlung der Mälzung gar nicht äquivalent ist. Die durch Papain herausgelöste Amylase verhält sich genau wie die freie Amylase.

Zwar ist man darüber einig, daß die Wirkung des Papains und gewisser anderer Präparate eine proteolytische Wirkung ist; dagegen divergieren die Ansichten darüber, ob die vergrößerte Amylasewirkung durch Freimachung von Enzym oder von Aktivatoren bedingt ist. Daß die erste Erklärung, wenigstens was die Gerste betrifft, die richtige ist, scheint uns aus verschiedenen Umständen hervorzugehen. In der unter (5) zitierten, von *Chrzaszcz* und *Janicki* übrigens nicht erwähnten Arbeit wurden Versuche erwähnt, die die Richtigkeit dieser Auffassung zu beweisen scheinen.

Die oben angeführten Tatsachen, daß die Stärkeverzuckerung mit Wasserextrakt und mit „Papainextrakt" von Gerste zu demselben Grenzwert führen, und daß die Jodfarbe der Versuchsmischungen in beiden Fällen zu gleicher Zeit verschwindet bzw. bestehen bleibt, sprechen ja eher für als gegen die Auffassung, daß die beiden Extrakte sich nur quantitativ unterscheiden. Sie sind jedoch selbstverständlich keine Beweise gegen die Aktivatortheorie. Um die Frage zu entscheiden, können wir aber folgende Überlegung machen:

Eine fein geriebene Suspension eines Gerstenmehles zeigt eine Amylasewirkung a, nach Behandlung mit Papain zeigt dieselbe Suspension die Wirkung $a + b$, wo b in den von uns untersuchten Fällen von derselben Größenordnung wie a war. Nun ist, wie gesagt, beinahe die ganze Menge „freier" Amylase wasserlöslich. Filtrieren wir also die ursprüngliche Suspension und waschen den ungelösten Rest, so bekommen wir im Filtrat I eine Amylasewirkung, die nur ein wenig kleiner ist als a. Der ausgewaschene Rest hat (in der Versuchslösung suspendiert) nur eine ganz kleine Amylasewirkung. Behandeln wir aber den ausgewaschenen Rest mit Papainlösung, so bekommen wir nach Filtrieren eine Lösung II, die also entweder:

1. eine Amylasemenge approximativ $= b$ enthält, oder
2. eine ganz kleine Amylasemenge nebst großen Mengen des hypothetischen Aktivators.

Untersuchen wir korrespondierende Mengen der Lösungen I und II und Mischungen von beiden, so werden wir finden, daß die Mischung im ersten Falle eine Wirkung hat gleich der Summe der Wirkungen der zwei Lösungen, im zweiten Falle dagegen eine Wirkung, die viel größer ist als diese Summe. Während unserer Arbeiten wurden Versuche dieser Art mit verschiedenen Gerstensorten oft ausgeführt. Hier sei unter Wiedergabe der Zahlen ein Versuch angeführt:

2 g Gerstenmehl wurden mit Sand und etwas Puffer sorgfältig gerieben, die Suspension auf 50 ccm aufgefüllt und dann 2 Stunden *langsam* geschüttelt. Dann wurde scharf zentrifugiert = Lösung I. Der Rest wurde mit 50 ccm Wasser in der Zentrifuge gewaschen (= Lösung A), dann in

50 ccm Wasser aufgeschwemmt = Suspension B. Zu 45 ccm dieser Suspension wurden 0,45 g Papain gesetzt. Nach 20 Stunden bei 30° wurde zentrifugiert = Lösung II. Amylasebestimmung in je 5 ccm der Präparate:

	Amylasemenge			Mittel
Lösung I	26,1	25,0	25,0	a = 25,4
Lösung A	1,8	2,0	2,4	
Suspension B . . .	4,9	5,0		
Lösung II	21,7	22,1	22,1	b = 22,0
Mischung von I + II	46,0	47,2	47,0	46,8
			Summe von a + b:	47,4

Es zeigt sich also, daß beide Lösungen I und II Amylasemengen von derselben Größenordnung enthalten und daß die Mischung der beiden Lösungen eine Wirkung zeigt, die genau gleich der Summe der einzelnen Wirkungen ist. Dies kann nach unserer Ansicht mit der Auffassung nicht in Einklang gebracht werden, daß die Papainwirkung hauptsächlich oder zu einem wesentlichen Teil in der Freimachung eines Amylaseaktivators besteht. Vielmehr sind wir gezwungen anzunehmen, daß in der Gerste ein Teil der β-Amylase frei ist, ein anderer Teil an Eiweiß gebunden.

Bei der natürlichen Keimung müssen wir annehmen, daß neben der Freisetzung der gebundenen β-Amylase auch andere Veränderungen im Amylasesystem stattfinden.

In diesem Zusammenhang sind einige Versuche über die Stabilität der freien und der gebundenen β-Amylase von Interesse.

Beispiel. 2 g Gerstenmehl wurden mit Sand und 40 ccm Phosphatpuffer von $p_H = 5{,}3$ feinst gerieben. Proben von 10 ccm wurden während einer halben Stunde auf verschiedene Temperaturen erhitzt. Von allen Proben wurde dann die Amylasewirkung in 3 ccm bestimmt. Der Rest (7 ccm) wurde mit 0,1 g Papain versetzt und 20 Stunden bei 30° stehengelassen. Dann wurde wieder die Amylasewirkung in je 3 ccm bestimmt:

Erhitzungstemperatur	Freie Amylase	Totalmenge	Gebundene Amylase
Nicht erhitzt	9,2	27,0	17,8
53°	6,3	14,2	7,9
55	4,2	8,1	3,9
60	0	0	0

Wir finden also ungefähr dieselbe Zerstörungsgeschwindigkeit bei der freien wie bei der gebundenen Amylase, möglicherweise ist die gebundene etwas weniger stabil. Dieses Resultat ist nicht ohne Interesse für die Frage, wie man sich die Bindung der Amylase am Eiweiß vorstellen soll. Der Umstand, daß die gebundene Amylase inaktiv ist (fehlende Aktivität ist bekanntlich keine notwendige Folge der Unlöslichkeit), legt den Gedanken nahe, daß die aktive Gruppe der Amylase bei der Bindung beteiligt ist. Daß die meisten Enzyme durch ihre Substrate vor Hitzeinaktivierung geschützt werden, wird ja auch im

allgemeinen so gedeutet, daß die Substrate eben durch die Bindung an der aktiven Gruppe dieselbe schützen. In unserem Falle ist der bindende Stoff zwar allem Anschein nach kein Substrat des Enzyms, immerhin hätte man jedoch vielleicht eine Schutzwirkung bei höherer Temperatur erwarten können. Andererseits ist bekannt, daß Enzyme, wie z. B. die Hefensaccharase, in gewissen Sorbaten weniger stabil sind als im freien Zustande. [Die gefundene Temperaturinaktivierung ist von ziemlich genau derselben Größe, wie die von *Ernström* (9) und anderen für die verzuckernde Wirkung der Malzamylase festgestellte.]

Wenn ein Enzym in einer Zelle in unlöslicher Form vorkommt, haben wir zu unterscheiden, ob das Enzym in wirksamer Form vorkommt (z. B. Ricinuslipase u. a.) oder aber in unwirksamer. Beispiel für den letzteren Fall ist die gebundene β-Amylase der Gerste. Analog damit sind die Fälle, wo in einem künstlich erzeugten Sorbat das Enzym, obgleich in der Versuchsmischung völlig unlöslich, voll wirksam ist, wie die Saccharase in gewissen Tonerdesorbaten (10), oder wo es im Sorbat unwirksam ist, jedoch durch die Elution wirksam wird. Wir wollen hier nur kurz erwähnen, daß solche Verhältnisse zweifelsohne in lebenden Zellen von enormer Bedeutung sein können. Die Zelle hat in solchen gebundenen Enzymen einen Reservevorrat, der bei Bedarf mobilisiert werden kann. Stoffe, die Enzyme temporär in inaktiver Form binden, können für die Zelle von ebenso lebenswichtiger Bedeutung sein wie die Enzyme selbst. Bekanntlich hat man Grund, anzunehmen, daß gewisse typische Krankheiten höherer Organismen in einer abnorm hohen, nicht wie sonst gesteuerten Enzymtätigkeit in gewissen Organen ihren Grund haben, und also zurückzuführen sind auf Fehlen oder Zerstören hemmender Substanzen. Ob man solche Substanzen dann Hemmungskörper, Sistoenzyme, unlösliche Träger oder einfach Sorbentia nennen will, ist ziemlich gleichgültig. Unter allen Verhältnissen dürfte man annehmen müssen, daß dabei spezifische Stoffe wirksam sind, nicht etwa, daß eine ziemlich unspezifische Sorption an ganzen Klassen von Verbindungen stattfindet.

Literatur.

1) Über die ältere Literatur siehe die ausgezeichnete Zusammenstellung in *Walton*: A comprehensive survey of starch chemistry. New York 1928. — 2) Zeitschr. f. physiol. Chem. **203**, 117, 1931. — 3) C. r. soc. biol. **87**, 1183, 1922; Meddelelser fra Carlsberg **16**, Nr. 7, 1926; Zeitschr. f. physiol. Chem. **189**, 17, 1930. — 4) *K. Myrbäck* u. *S. Myrbäck*, Monatsbl. d. Ver. schwed. Brauer **1932**, Nr. 3, 5 und 6; **1933**, Nr. 3 und 7; *Myrbäck* u. *H. Larsson*, ebenda **1934**, Nr. 10; *Myrbäck* u. *Dahlgren*, ebenda **50**, 361, 1935. — 5) Diese Zeitschr. **258**, 158, 1933. — 6) Ebenda **272**, 402, 1934; **274**, 274, 1934; **278**, 112, 1935; Biochem. J. **28**, 1949, 1934. — 7) *Chrzaszcz* u. *Janicki*, diese Zeitschr. **281**, 408, 1935. — 8) *Willstätter* u. *Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**, 161, 1924. — 9) *Ernström*, ebenda **119**, 190, 1922. — 10) *Michaelis*, diese Zeitschr. **7**, 488, 1907/08.

Zur Kenntnis der Stärkespaltung durch pflanzliche Amylasen. I.

Von

K. Myrbäck.

(Aus dem biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 16. März 1936.)

Der Mechanismus der enzymatischen Stärkespaltung ist trotz intensivster Arbeit noch in manchen Punkten unbekannt. Unter anderem ist die Frage der Entstehung der sogenannten Grenzdextrine und ihrer Natur ungelöst. Daß die Verzuckerungsgrenze sowohl mit der Art und Vorbehandlung der Stärke wie mit dem Ursprung und der Behandlung des enzymhaltigen Materials stark variiert, ist bekannt. Ohne auf die große Literatur über die Grenzverzuckerung oder auf diskutierte oder denkbare Erklärungen einzugehen, teile ich im folgenden kurz gewisse Beobachtungen mit, die für das Problem Interesse haben.

I. Amylasespaltung nach Oxydation der Endgruppen.

Die angewandten Stärkepräparate (native Stärke, lösliche Stärke) reduzieren Hypojodit ein wenig. Da die Grenzdextrine, wenigstens nach meiner Erfahrung, auch nach sehr sorgfältigem Umfällen wesentlich stärker reduzieren als die Stärke, woraus sie hervorgegangen sind, und da andererseits Stärkepräparate, die keine oder nur eine verschwindend kleine Reduktion zeigen wie *Zulkowski*-Stärke, von Amylase glatt gespalten werden, in gewissen Fällen vielleicht sogar weitgehender als gewöhnliche Stärke[1], so liegt die Frage nahe, ob die Entstehung der reduzierenden Grenzdextrine mit dem Vorhandensein reduzierender Gruppen in der Stärke etwas zu tun hat. Auch für die Frage, wie man sich den Angriff der verschiedenen Amylasen auf die Stärke vorstellen soll, sind Versuche über die Bedeutung der reduzierenden Gruppen nicht ohne Interesse. Zunächst wurde untersucht, wie die Überführung der reduzierenden Endgruppen in Carboxylgruppen die Spaltbarkeit der Stärke durch Amylasen beeinflußt.

Beispiel: a) 450 mg Stärke in 49 ccm Phosphatpuffer von $p_H = 5{,}3$. Dazu 1 ccm β-Amylase aus ungekeimter Gerste. Maltosebestimmung in Proben von 5 ccm nach passenden Zeiten nach *Willstätter-Schudel*. b) 450 mg Stärke in 10 ccm Wasser wurde mit 1 ccm 0,15 n Jod versetzt, dann schwacher Überschuß von Thiosulfat, dann 1 ccm n NaOH. Schließlich wurde mit H_2SO_4 neutralisiert, mit Phosphatpuffer auf 49 ccm verdünnt, dann 1 ccm Enzym zugesetzt usw. c) 450 mg Stärke in 10 ccm wurden mit 1 ccm Jod und 1 ccm NaOH versetzt. Nach 40 Minuten wurde angesäuert, unverbrauchtes Jod mit Thiosulfat reduziert, dann die Lösung neutralisiert usw.

[1] *K. Myrbäck* u. *S. Myrbäck*, diese Zeitschr. **258**, 158, 1933.

Versuchszeit Min.	mg Maltose			Versuchszeit Min.	mg Maltose		
	a	b	c		a	b	c
0,5	2,8	2,8	2,8	10	26,3	26,6	27,5
3	17,0	16,9	17,1	900	31,7	31,6	32,6
6	23,5	22,7	23,9				

Die Oxydation der reduzierenden Gruppen, die als vollständig angesehen werden kann (großer Jodüberschuß und lange Einwirkung) beeinflußt also weder die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung durch β-Amylase noch die schließliche Ausbeute an Maltose (die „Verzuckerungsgrenze"). Daß die zugesetzten Salze an und für sich keine Einwirkung haben, sieht man aus Versuch b. Es ergibt sich, daß für die Stärkespaltung durch β-Amylase die reduzierenden Gruppen in der Stärke ohne Bedeutung sind. Der Angriff des Enzyms kann also nicht von den reduzierenden Endgruppen der Ketten aus geschehen. Es könnte eingewendet werden, daß die Anzahl der reduzierenden Gruppen in der Stärke so klein ist, daß eine Wirkung ihrer Oxydation vorhanden sein kann, ohne daß sie in den Versuchen zum Ausdruck kommt. Dann wäre zu erwarten, daß die Spaltbarkeit der stärker reduzierenden Grenzdextrine durch eine Oxydation stärker beeinflußt werden soll. Versuche darüber sind im Gange.

Entsprechende Versuche wurden mit α-Amylase (Dextrinogenamylase, durch partielle Inaktivierung nach *Ohlsson* hergestellt) ausgeführt. Dieselbe Versuchsmischung. Proben von 1 ccm mit 9 ccm Wasser verdünnt und mit 1 Tropfen n/10 Jodlösung versetzt.

Zeit Min.	Farbe mit Jod		Zeit Min.	Farbe mit Jod	
	gewöhnliche Stärke	oxydierte Stärke		gewöhnliche Stärke	oxydierte Stärke
0	blau	blau	35	rötlich	rötlich
5	blauviolett	blauviolett	50	gelbbraun	gelbbraun
15	violett	violett	600	farblos	farblos
25	„	„			

Auch in diesem Falle keine Unterschiede. Es können also bezüglich der α-Amylase dieselben Schlüsse gezogen werden wie bezüglich der β-Amylase.

II. Einwirkung der zwei Malzamylasen, allein und in Mischung.

Daß „Malzamylase" (= α-Amylase + β-Amylase) eine höhere Verzuckerungsgrenze zeigt als „Gerstenamylase", d. h. praktisch reine β-Amylase, ist lange bekannt. Dagegen weiß man nicht mit Sicherheit, ob die höhere Maltoseausbeute durch die Mitwirkung der α-Amylase oder durch andere Faktoren bedingt ist. Zu den folgenden Versuchen kamen folgende Enzymlösungen zur Verwendung: a) β-Amylase: Gersten-

mehl mit 4 Teilen Wasser + Toluol 18 Stunden extrahiert; b) Malzamylase: Bei niedriger Temperatur getrocknetes Grünmalz in derselben Weise extrahiert; c) α-Amylase: Ein Teil der Malzamylaselösung wurde über freier Flamme auf 77° erhitzt. Während 10 Minuten durfte die Temperatur auf 69° sinken. Dann wurde gekühlt und filtriert.

A. Wirkung der Amylaselösungen auf Stärke.

Je 1 ccm Enzymlösung zu 49 ccm einer Lösung von 520 mg *Lintner*-Stärke in Phosphatpuffer. Proben zur Bestimmung der Jodfarbe (1 ccm) und der Reduktion (5 ccm) nach passenden Zeiten:

Zeit	β-Amylase		Malzamylase		α-Amylase	
Min.	mg Maltose	Farbe	mg Maltose	Farbe	mg Maltose	Farbe
3	9,5	blau	12,3	violett	1,0	violett
5	15,7	„	19,4	rotviolett	1,7	„
9	22,9	„	25,9	braun	2,5	rotviolett
20	28,2	„	—	farblos	5,2	rotbraun
30	—	„	—	—	—	farblos
1200	35,0	violett	41,6	—	19,8	—

Die Malzamylase hat also wie gewöhnlich eine wesentlich höhere Verzuckerungsgrenze als die zwei isolierten Amylasen. Auffallend ist der sehr niedrige Wert für die α-Amylase. Die verzuckernde Wirkung dieser Lösung ist ja auch von Anfang an sehr schwach, während die Stärke abbauende Wirkung, nach der Jodfärbung beurteilt, durch die Erhitzung nur wenig abgenommen hat.

B. Wirkung der drei Amylaselösungen auf ein Grenzdextrin, durch Einwirkung von β-Amylase auf Stärke gewonnen.

300 g lösliche Stärke in 3 Liter Wasser von 40° wurden mit Wasserextrakt aus 10 g Gerstenmehl versetzt und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt (Toluol). Nach 5 Tagen nahm die Reduktion nicht weiter zu. Nach 10 Tagen wurde filtriert und mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde zweimal aus Wasser umgefällt, dann mit Alkohol und Äther getrocknet. Lösung wird von Jod blauviolett gefärbt. Zu den folgenden Versuchen 615 mg in 50 ccm Totalvolumen:

Zeit	β-Amylase		Malzamylase		α-Amylase	
Min	mg Maltose	Farbe	mg Maltose	Farbe	mg Maltose	Farbe
3	—	blauviolett	2,8	violett	1,3	violett
5	—	„	5,2	„	2,2	„
7	—	„	7,5	rotviolett	3,0	rotviolett
14	2,2	„	12,0	„	4,2	„
20	—	„	—	braun	4,9	braun
40	3,3	„	18,1	farblos	8,3	farblos
250	3,9	„	22,8	—	13,9	—
1400	—	„	29,0	—	18,6	—
2800	8,9	violett	—	—	—	—
5700	14,1	„	38,5	—	26,6	—

Wie zu erwarten, ist die Einwirkung der β-Amylase sehr gering. Malzamylase spaltet dagegen schnell zu etwa 30%, danach langsam weiter. Bemerkenswert ist, daß durch α-Amylase allein eine ziemlich rasche und weitgehende Spaltung des Grenzdextrins eintritt. Damit ist bewiesen, daß die höhere Verzuckerungsgrenze der „Malzamylase" wenigstens teilweise darauf beruht, daß die darin vorkommende α-Amylase „Dextrine" abzubauen vermag, die von der β-Amylase nicht angegriffen werden. Vielleicht kann man auch die Sache so ausdrücken, daß die β-Amylase eine Komponente der Stärke unangegriffen läßt (das „Grenzdextrin" wird ja durch Jod blau gefärbt), die von der α-Amylase gespalten werden kann.

Erwiderung auf die Bemerkungen von Kapeller-Adler über meine in dieser Zeitschrift *283*, 199, 1936 erschienene Arbeit.

Von

Franz Földes.

Auf die „Bemerkungen" von *Kapeller-Adler* zu meiner, in vorliegender Zeitschrift erschienenen Arbeit gestatte ich mir, folgendes festzustellen:

Bei der Beschreibung der Methode, die ich zum qualitativen Nachweis von Histidin empfahl, hob ich deutlich hervor, daß diese Reaktion nicht durch das Histidin selbst, sondern durch irgendeines seiner Spaltungsprodukte bedingt wird, oder aber durch eine Substanz, die gleichzeitig mit dem Histidin zur Ausscheidung gelangt.

Der genauere Nachweis dieser Substanz ist bisher noch nicht gelungen. Ebenfalls noch zum größten Teil unbekannt sind ja auch die Stoffe, die bei mit Stoffwechselsteigerungen verbundenen Zuständen, wie z. B. bei Schwangerschaft, infolge unvollständiger Verbrennung im Harn erscheinen. Auf diese Stoffe wies in letzter Zeit *A. Bickel* (1) hin, und zwar gerade in Verbindung mit einer Arbeit von *Kapeller-Adler* (2). Er nannte den sich dabei abspielenden Vorgang dysoxydative Carbonurie. Nach seiner Auffassung ist die Histidinurie im allgemeinen und daher auch die Schwangerschafts-Histidinurie nur als eine Teilerscheinung dieser dysoxydativen Carbonurie aufzufassen.

Dieser Gedankengang wird nun nachdrücklichst durch die Tatsache bekräftigt, daß die von mir beschriebene Farbreaktion bei den mehr als 120 von mir in dieser Hinsicht untersuchten Harnproben mit zwei Ausnahmen nur in solchen Fällen eintrat, in welchen sich das Histidin durch die modifizierte *Knoop-Voges*che Methode nachweisen ließ. *Mit anderen Worten in Harnproben, in denen Histidin nachgewiesen werden konnte, trat in allen Fällen die für meine Reaktion charakteristische orangegelbe Färbung auf.* Die nach Zusatz von Brom zu histidinhaltigem Harn in Erscheinung tretende orangegelbe Farbe kann nicht verwechselt werden mit dem zitronengelben Farbton, der bei nicht Histidin enthaltenden Harnproben auftritt.

Zur Behauptung von *Kapeller-Adler*, daß Histidin mit der modifizierten *Knoop-Voges*chen Probe nicht nachgewiesen werden kann, stellte ich fest: 1. Die Reaktion ist bei einer Lösung des *Hoffmann la Roche*schen Histidinchlorhydrates in dest. Wasser immer positiv. Auf Zusatz von 0,1 bis 0,2 ccm des in meiner Arbeit angegebenen Bromreagens zu 5 ccm einer 1%igen Lösung und darauffolgendem Erwärmen entsteht eine dunkelkirschrote Farbe, die sich beim Stehenlassen vertieft und beständig ist. Bei Verwendung einer 0,10‰igen Lösung vertieft sich die zustandekommende rosarote Verfärbung ebenfalls mit der Zeit und ist gleichfalls beständig. Die Reaktion ist auch bei solchen Harnproben positiv, zu denen Histidin erst nachträglich zugesetzt wird. Bei solchen Proben, speziell aber bei Harnen, die schon bei der Entleerung Histidin enthalten, erreichen wir die intensivste, rosarote Farbe dann, wenn wir 0,1 bis 0,2 ccm weniger Brom als seinem Sättigungsgrade entspricht (nachzuweisen mit KJ-haltiger Stärke!) zu 5 ccm Harn zusetzen und vorsichtig erwärmen, ohne daß es dabei bis zum Sieden kommt.

Bei der Ausführung der von mir modifizierten Reaktion kommt es nicht so sehr darauf an, daß das Medium mit Brom gesättigt ist, als darauf, daß

genügend Brom zur Verfügung steht, damit die auf Substitution oder Oxydation beruhende Farbreaktion eintreten kann. Vollständige Sättigung wäre nur dann notwendig, wenn die Affinität des Histidins zu Brom kleiner wäre als die irgendeines anderen Stoffes im Harn. Des weiteren ist die entstehende Farbe, wenn die Probe bis zum Siedepunkt erwärmt wird, nur für Augenblicke sichtbar und verschwindet sofort wieder, speziell dann, wenn der Harn vollkommen mit Brom gesättigt ist. Im Gegensatz dazu steigert sich bei Verwendung von weniger Brom und bei vorsichtigem Erwärmen die Intensität der auftretenden Farbe noch eine gewisse Zeit hindurch, besonders dann, wenn mit dem Erwärmen nach Auftreten der Farbe sofort ausgesetzt wird. In diesem Falle stehen zur Ablesung des Resultates mehrere Minuten zur Verfügung.

Zur Modifikation der Reaktion von *Kapeller-Adler* habe ich folgendes zu bemerken: Mit der ursprünglichen Reaktion von *Kapeller-Adler* gelang der Nachweis von Histidin niemals, weder in Harnproben von Schwangeren, noch in solchen von Nichtschwangeren, wenn die modifizierte *Kapeller-Adler*sche Reaktion negative Werte ergab. Trotzdem muß ich die auf quantitativen Untersuchungen beruhende Feststellung von *Kapeller-Adler* anerkennen, wonach der auf einmal erfolgende Zusatz der gesamten Brommenge zu Histidinverlusten führt. Dieser Histidinverlust im Harn muß aber in demselben Maße wie bei Schwangeren auch bei Nichtschwangeren möglich sein. Wenn also der Vorwurf von *Kapeller-Adler* zu Recht besteht, daß mit der von mir empfohlenen Methode der Histidinnachweis im Harn Schwangerer in weniger Fällen gelang, so erklärt dies aber noch lange nicht die Tatsache, daß mit dieser weniger empfindlichen Methode in einem größeren Prozentsatz von Harnproben Nichtschwangerer Histidin nachgewiesen werden konnte. *Die zur Verläßlichkeit einer Schwangerschaftsreaktion notwendige und gleichzeitig auch hinreichende Grundbedingung kann nur darin liegen, daß die Reaktion bei Schwangeren in einem möglichst hohen Prozentsatz positiv sei, bei Nichtschwangeren aber nie eintritt.*

Dieses Ziel konnte aber weder ich, noch sonst jemand erreichen, der die Reaktion von *Kapeller-Adler* nachprüfte. So erhielt z. B. *G. Roselli* (3) bei der Untersuchung von 111 Harnproben von Nichtschwangeren 87 negative und 34 zweifelhafte, bei der Untersuchung von 211 Harnproben von Schwangeren 132 negative, 39 zweifelhafte und nur 40 positive Ergebnisse. *K. Brandsch* (4) erhielt bei 121 im ersten bis fünften Schwangerschaftsmonat befindlichen Personen 19 %, bei 56 aus dem sechsten bis zehnten Monat 9 % und bei 120 Nichtschwangeren 10 % Fehlresultate. *Oligmacher* (5) bekam bei der Untersuchung von 145 Harnproben Nichtschwangerer 14 positive, bei der von 76 Schwangeren 44 positive, 2 fragliche und 30 negative Ergebnisse, bei 24 Schwangeren im Frühstadium 11 negative und 13 positive Resultate. *Göczy* (6) fand bei der Untersuchung von 80 Harnproben Schwangerer 52½ % positive, 15 % negative und 32½ % fragliche Resultate. Ähnliche Ergebnisse zeitigten auch die Untersuchungen von *R. Bolaffi* (7) und *Pelidzari* und *Rainer* (8). Die Untersuchungen von *Bodó* (9) kommen noch den von *Kapeller-Adler* publizierten Ergebnissen am nächsten (bei Schwangeren 6 %, bei Nichtschwangeren 11 % Fehlresultate); ebenso die von *N. Adlers* (10) (bei Schwangeren 1 %, bei Nichtschwangeren 7 %, bei Tubenschwangerschaft 60 % Fehler). Selbst bei den Untersuchungen, die *Kapeller-Adler* im Auftrage von *O. Frankl* (11) ausführte, finden sich bei 51 Schwangeren 3 negative und bei 75 Nichtschwangeren 12 positive Resultate.

Literatur.

1) *A. Bickel*, Klin. Wochenschr. **1936**, I, 199. — 2) *Kapeller-Adler* u. *W. Schiller*, ebenda **1935**, II, 1790. — 3) *G. Roselli*, Clin. Ostetr. 193—197, 1935. — 4) *K. Brandsch*, Zentralbl. f. Gynäk. 132—134, 1935. — 5) *Ohligmacher*, Klin. Wochenschr. **1934**, II, 1078. — 6) *Göczy*, Gyógyászat **75**, 131, 1935. — 7) *R. Bolaffi*, Riv. Ital. Gynek. **17**, 489—532, 1935. — 8) *Pelidzzari* u. *Rainer*, Bol. Soc. Ital. Biol. **9**, 517—518, 1934. — 9) *Bodó*, Orvosi Hetilap **78**, 33, 1934. — 10) *N. Adlers*, Zentralbl. f. Gynäk. **58**, 1231, 1934. — 11) *O. Frankl*, ebenda **58**, 1231, 1934.

Schlußbemerkung zur Arbeit: „Franz Földes, Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin“[1].

Von **Regine Kapeller-Adler.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 12. März 1936.)

Da der Autor in seiner Erwiderung neuerdings hervorhebt, daß die von ihm zum Histidinnachweis empfohlene Methode *„durch das Histidin selbst nicht bedingt wird“*, erscheint eine weitere Diskussion gegenstandslos, zumal Methoden existieren, welche die Erfassung des Histidins in eindeutiger Weise gewährleisten. Gerade bei der Untersuchung einer so heterogenen Flüssigkeit, wie sie der Harn darstellt, kann auf Nebenreaktionen — mögen sie auch noch so interessant erscheinen — nicht Rücksicht genommen werden, sondern müssen ausschließlich eindeutige und spezifische Methoden verwendet werden.

Zu den vom Autor als Stützbeweis für seine Resultate zitierten schlechten Ergebnisse anderer Verfasser, welche sich mit der Brauchbarkeit der von mir angegebenen Histidinmethode für den Schwangerschaftsnachweis beschäftigten, sei hervorgehoben, daß neben diesen Arbeiten auch andere bekannt geworden sind, welche über gute Resultate berichten. Zu diesen gehören neben den schon von *Földes* angeführten Untersuchungen von *Alders*[2] und *Bodo*[3] vor allem auch diejenigen von *Valle*[4], *Chomet*[5], *Stern*[6] und *Asitaka*[7].

Bei den ersten von mir mit *O. Frankl*[2] durchgeführten Untersuchungen gelangte noch die ursprüngliche, mit vielen Fehlern behaftete Methode zur Anwendung, worauf ich schon seinerzeit hingewiesen habe[2].

Die Diskrepanz in den Befunden der einzelnen Autoren beweist, daß die von mir angegebene Reaktion zur Schwangerschaftsdiagnose trotz ihrer Einfachheit *sehr heikel* ist und demnach ein sehr *sorgfältiges Einhalten der gegebenen Vorschrift*, sowie eine *größere Übung im Beurteilen der Resultate* erfordert. Denn nur so ist es zu erklären, daß einzelne Untersucher gute, andere wieder schlechte Resultate zeitigen konnten.

Im übrigen wird demnächst eine *genaue Beschreibung* der inzwischen in einzelnen Punkten von mir verbesserten Methode zum Schwangerschaftsnachweis, welche die Zahl der zweifelhaften Reaktionen auch in der Hand des Mindergeübten auf ein Minimum herabsetzt, erscheinen.

[1] Diese Zeitschr. **283**, 199, 1936. — [2] Zentralbl. f. Gynäkol. **58**, 1231, 1934. — [3] Ovosi Hetilap. **78**, 33, 1934. — [4] Boll. della Soc. Piem. di Ostetr. **4**, 1934. — [5] Med. Klin. **48**, 1934. — [6] Zentralbl. f. Gynäkol. **39**, 2305, 1934. — [7] Ronas Ber. **91**, 252, 1936.

Jodmethylat des Nicotinsäureamids.

(Kurze Mitteilung.)

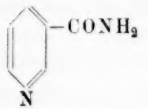
Von

Paul Karrer und **Otto Warburg.**

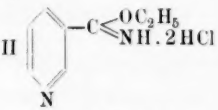
(Aus dem Chemischen Institut der Universität Zürich und dem Kaiser Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 31. März 1936.)

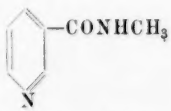
Wir haben Pyridinkörper gesucht, die, wie die Wirkungsgruppe des wasserstoffübertragenden und des Gärungs-Co-Ferments, von Hydrosulfit partiell und reversibel hydriert werden[1]. Folgende Substanzen wurden (von *P. Karrer*) dargestellt:

I 

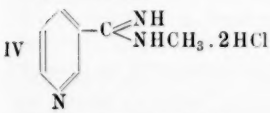
Nicotinsäure-amidjodmethylat Schmelzpunkt 203—205° (Zersetzung).

II 

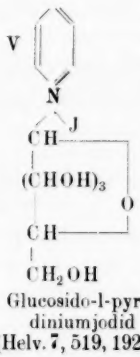
Nicotinsäure-iminoäthyläther. Schmelzpunkt 233° (vorher sintern).

III 

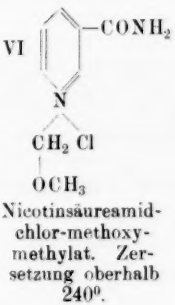
Nicotinsäuremethylamid. Schmelzpunkt 100°.

IV 

Nicotinsäure-N-methylamidin. Zersetzungspunkt 235° (unscharf).

V 

Glucosido-l-pyridiniumjodid (Helv. **7**, 519, 1924).

VI 

Nicotinsäureamid-chlor-methoxy-methylat. Zersetzung oberhalb 240°.

Von diesen sechs Pyridinkörpern reagieren (bei Zimmertemperatur und p_H 8) nur I und V merklich mit Hydrosulfit. Körper V reagiert langsam und wird zu einer Substanz hydriert, die mit der hydrierten

[1] Ein erstes, aber aus verschiedenen Gründen noch unbefriedigendes Beispiel, war das Methylbetain der Nicotinsäure (Trigonellin); vgl. *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **282**, 157, 1935; **285**, 156, 1936.

Wirkungsgruppe der Co-Fermente nicht vergleichbar ist. Körper I, das Jodmethylat des Nicotinsäureamids, reagiert ebenso schnell wie die Wirkungsgruppe der Co-Fermente und wird zu einer Substanz hydriert, die in ihren spektralen Eigenschaften mit der Wirkungsgruppe der Co-Fermente übereinstimmt. Insbesondere tritt bei der Hydrierung des Körpers I dieselbe intensive grünlichweiße Fluoreszenz wie bei der Hydrierung der Co-Fermente auf. Wie die hydrierten Co-Fermente wird der hydrierte Körper I durch gelbes Ferment reoxydiert, wobei die Fluoreszenz wieder verschwindet. In beiden Fällen erscheint bei der Hydrierung eine langwellige Bande um 345 mμ.

In beiden Fällen verschwinden die Bande 345 mμ und die Fluoreszenz beim Ansäuern und es tritt eine neue Bande um 295 mμ auf.

Die Höhe der Bande 295 mμ des hydrierten Körpers I ist:

$$\beta_{295} = 375 \frac{\text{qcm}}{\text{mg Nicotinsäureamid}}.$$

Die Höhe der Bande 295 mμ des wasserstoffübertragenden Co-Ferments ist:

$$\beta_{295} = 50 \frac{\text{qcm}}{\text{mg Co-Ferment}}.$$

Der Gehalt des Co-Ferments an Nicotinsäureamid, berechnet aus der Höhe der Banden 295 mμ, ist also

$$\frac{50}{375} \cdot 100 = 13{,}3\%.$$

Etwa den gleichen Prozentgehalt an Nicotinsäureamid berechnet[1] man aus dem Gewicht des bei der Hydrolyse des Co-Ferments erhaltenen Prikrolonats.

[1] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **282**, 157, 1935.

Einfluß der Ketonkörper auf die Serumlipase.

Von

J. Benedict und G. Mayer.

(Aus der III. medizinischen Universitätsklinik der kgl. ung. Pázmány-Péter-Universität.)

(Eingegangen am 12. Februar 1936.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

Zur Entscheidung der Frage, welche Rolle bestimmte Ketonkörper (Aceton, α-, β- und γ-Oxybuttersäure) bei der Störung des Fettstoffwechsels der Diabetiker spielen, untersuchten wir den Einfluß dieser Ketonkörper auf die lipolytische Fähigkeit des Serums. Wenn nämlich durch eine Anhäufung der Ketonkörper im Blutserum der Lipasetiter abnehmen würde, so könnte man annehmen, daß die Ursache der Fettstoffwechselstörung der Schwerdiabetiker und Komatösen in der Unwirksamkeit des fettspaltenden Ferments zu suchen ist. Ein solcher Zusammenhang würde erst dann wahrscheinlich werden, wenn schon bei einer geringen Ketonkörperkonzentration, welche bei Azidose vorkommt, eine Giftwirkung auf die Lipase zu beweisen wäre.

Die Giftwirkung der β-Oxybuttersäure auf verschiedene fermentative Prozesse wurde zuerst von *Harpuder* und *Erbsen* studiert. Diese Autoren untersuchten unter anderem auch die Serumlipase und fanden mittels der Tropfmethode von *Rona* und *Michaelis*, daß n/200 β-Oxybuttersäure die Enzymwirkung deutlich, n/25 β-Oxybuttersäure schon fast vollständig hemmt. In derselben Arbeit verweisen aber *Harpuder* und *Erbsen* auf die starke Kapillaraktivität der β-Oxybuttersäure, weswegen solche Methoden, welche die Veränderungen der Oberflächenspannung messen, nicht ganz zuverlässig sind. Wir selbst kamen zur gleichen Überzeugung, als wir noch in Berlin im Laboratorium von *Lichtwitz* mit unserem damaligen Mitarbeiter *K. L. Zirm* ebenfalls stalagmometrisch die Giftwirkung der verschiedenen Buttersäuren zu prüfen begannen.

Wir verwendeten deswegen zu unseren jetzigen Versuchen die von *Rona* und *Lasnitzki* angegebene mit dem *Warburg*-Manometer auszuführende gasometrische Lipasebestimmung.

Die bei der Methode aus der bicarbonathaltigen Ringerlösung freiwerdende Kohlensäure ist der durch Spaltung entstandenen Buttersäure proportional. Die Spaltungsgeschwindigkeit oder auch die Menge der vorhandenen aktiven Lipase kann somit mit Gleichung $k = x/t$ ausgedrückt werden.

Bei unseren Versuchen erwies sich eine kleine Veränderung an den von *Rona* und *Lasnitzki* angegebenen Gefäßen als zweckmäßig. Wir haben in die Seitentrögchen der Gefäße, in welche die Tributyrinlösung kommt, eine Glasnadel einlöten lassen. Dadurch wird erreicht, daß das Einfließen des Tributyrins in den Hauptraum der Gefäße glatt ohne Hindernisse vor sich

geht; somit kann auch das Herausheben der Tröge aus dem Wasserbad zum Einkippen des Tributyrins vermieden werden. Dies vereinfacht nicht nur die Untersuchung, sondern es können damit viele störende Momente (Auftreten von Bläschen in der Sperrflüssigkeit, zu starke Abkühlung des Systems) beseitigt werden. Die geänderte Form des Troges zeigt Abb. 1.

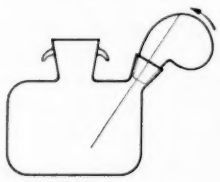


Abb. 1.

Die Versuche haben wir mit Meerschweinchen- und Menschenserumlipase ausgeführt und die Versuchsbedingungen so gewählt, daß die Anfangstiterwerte der beiden Sera möglichst gleich waren. Wir mußten dazu das Meerschweinchenserum in zehnmal stärkerer (1 : 300) Verdünnung anwenden als das Menschenserum (1 : 30). Die optimale Wasserstoffionenkonzentration, welche für Serumlipase zwischen $p_H = 8$ und 9 liegt, wird durch eine Ringerlösung folgender Zusammensetzung hergestellt: 100 ccm 0,9 % NaCl, 2 ccm 1,2 % KCl, 2 ccm 1,76 % $CaCl_2$, 20 ccm 1,26 % $NaHCO_3$. Wir kontrollierten die Reaktion unseres Systems am Ende der Spaltung elektrometrisch.

Die allgemeine Versuchsanordnung war folgende:

Trog 1: Thermobarometer (3 ccm Ringerlösung).
„ 2: 2,7 ccm mit Ringerlösung verdünntes Serum plus 0,3 ccm Ringerlösung (Untersuchung der Autolyse).
„ 3: 2,7 ccm mit Ringerlösung verdünntes Serum plus 0,3 ccm Tributyrin.
„ 4: 2,7 ccm mit Ringerlösung verdünntes Serum plus 0,3 ccm mit Ringerlösung verdünntes Aceton.
„ 5: 2,7 ccm mit Ringerlösung verdünntes Serum plus 0,3 ccm acetonhaltige Tributyrinlösung.

Der Zusatz des Acetons wurde in folgender Weise vorgenommen: 9 ccm der z. B. 0,3 % Aceton enthaltenden Ringerlösung werden mit 1 ccm Tributyrin geschüttelt. Aus der geschüttelten Lösung kommen 0,3 ccm in das seitliche Gefäß des Troges, welches mit den im Hauptraum befindlichen 2,7 ccm verdünnten Serums zusammengegossen eine 1 % Tributyrin und 30 mg-% Aceton enthaltende Lösung ergibt.

Alle Versuchsserien wurden sofort nach Beendigung, meistens in denselben Gefäßen, wiederholt. Die Wiederholungen ergaben nie Abweichungen von mehr als 5 %; die in den Tabellen angeführten Zahlen sind immer Mittelwerte zweier solcher Parallelversuche.

Der Grad der Vergiftung (h) kann in Prozenten nach der Gleichung $h = \frac{k_0 - k_1}{k_0} \cdot 100$ ausgedrückt werden, wo k_0 die Geschwindigkeitskonstante der Spaltung ohne Gift, k_1 die Geschwindigkeitskonstante des vergifteten Serums bedeutet.

Tabelle I. Versuche mit Aceton.
(Meerschweinchenserumlipase, Verdünnung 1 : 300, $p_H = 8{,}1$.)

Aceton mg-%	k_0	k_1	Hemmungsgrad (h) %	Aceton mg-%	k_0	k_1	Hemmungsgrad (h) %
30	0,107	0,110	+ 2,7	100	0,108	0,097	— 10
30	0,120	0,124	+ 3,2	100	0,107	0,100	— 6,5
50	0,099	0,100	± 0	200	0,122	0,111	— 9

Tabelle II.

(Menschenserumlipase, Verdünnung 1 : 30, $p_H = 8{,}1$.)

Aceton mg-%	k_0	k_1	Hemmungsgrad (h) %	Aceton mg-%	k_0	k_1	Hemmungsgrad (h) %
30	0,125	0,126	+ 0,8	150	0,103	0,103	± 0
80	0,099	0,095	— 4	350	0,110	0,096	— 12,7

In Tabelle I und II bedeuten die Geschwindigkeitskonstanten Durchschnittswerte, welche wir nach der meistens 40 Minuten lang verlaufenen Spaltung aus den einzelnen Punkten der Spaltungskurve errechneten.

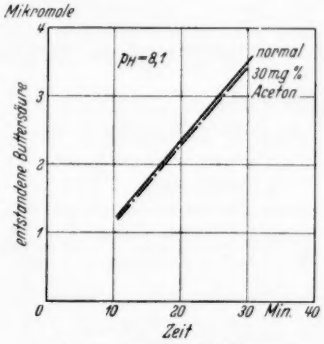


Abb. 2. Meerschweinchenserumlipase. Verdünnung 1 : 300 mit 30 mg-% Aceton. Temp. 36,9° C.

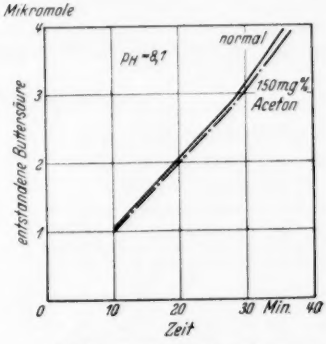


Abb. 3. Menschliche Serumlipase. Verdünnung 1 : 30 mit 150 mg-% Aceton. Temp. 37° C.

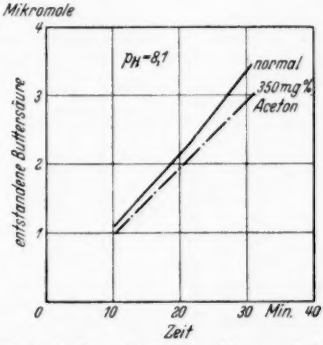


Abb. 4. Menschliche Serumlipase. Verdünnung 1 : 30 mit 350 mg-% Aceton. Temp. 37° C.

Aus den Tabellen und den Kurven (Abb. 2, 3 und 4) ergibt sich, daß eine deutliche Giftwirkung des Acetons bei der Meerschweinchenserumlipase in einer Konzentration von 100 bis 200 mg-%, bei der

Menschenserumlipase erst bei 350 mg-% in Frage kommt. Aber auch bei diesen hohen Konzentrationen beträgt die Giftwirkung nur 10 bis 12 %.

In den Versuchen der Tabellen I und II erfolgte die Zugabe des Acetons zur Lipase maximal 10 Minuten vor der ersten Ablesung. Wiederholungen der Versuche, in denen wir das Aceton kürzere oder längere Zeit einwirken ließen, führten zu übereinstimmenden Ergebnissen.

Von den Oxybuttersäuren untersuchten wir neben der β-Oxybuttersäure auch die α- und γ-Oxybuttersäure, obwohl die beiden letzteren Säuren keine biologische Bedeutung haben. Wir erwarteten, daß die α- und γ-Oxybuttersäure in vitro keine so starke Giftwirkung zeigen würden wie die β-Oxybuttersäure.

Der Zusatz der Oxybuttersäuren erfolgte im wesentlichen wie bei Aceton beschrieben. In das Seitengefäß brachten wir 0,2 ccm 10 %ige

Versuche mit Oxybuttersäuren.

Tabelle III (siehe Abb. 5, 6 u. 7).
(Meerschweinchenserumlipase, Verdünnung 1 : 300.)

p_H	α-Oxybuttersäure mg-%	Geschwindigkeitskonstanten (k)	Grad der Hemmung (h) %
8,1	0	0,125	—
	50	0,108	13,6
	70	0,085	32
8,68	100	0,053	57,6
	130	0,036	71
	150	0,000	100

p_H	β-Oxybuttersäure mg-%	Geschwindigkeitskonstanten (k)	Grad der Hemmung (h) %
8,1	0	0,105	—
	50	0,100	4,7
	70	0,072	31
8,4	100	0,033	68
	110	0,021	80
	120	0,000	100

p_H	γ-Oxybuttersäure mg-%	Geschwindigkeitskonstanten (k)	Grad der Hemmung (h) %
8,1	0	0,117	—
	50	0,092	21
	80	0,070	57
8,78	100	0,041	65
	120	0,022	81
	135	0,000	100

Tabelle IV (siehe Abb. 8, 9 u. 10).
(Menschenserumlipase, Verdünnung 1 : 30.)

p_H	α-Oxybuttersäure mg-%	Geschwindigkeitskonstanten (k)	Grad der Hemmung (h) %
8,1	0	0,110	—
	50	0,110	0
	70	0,100	10
8,6	100	0,072	34
	120	0,042	61
	150	0,000	100

p_H	β-Oxybuttersäure mg-%	Geschwindigkeitskonstanten (k)	Grad der Hemmung (h) %
8,1	0	0,125	—
	50	0,117	6
	80	0,101	19
8,4	120	0,068	45
	140	0,041	67
	160	0,000	100

p_H	γ-Oxybuttersäure mg-%	Geschwindigkeitskonstanten (k)	Grad der Hemmung (h) %
8,1	0	0,120	—
	40	0,116	3
	50	0,105	10
8,8	80	0,080	33
	100	0,055	54
	130	0,005	100

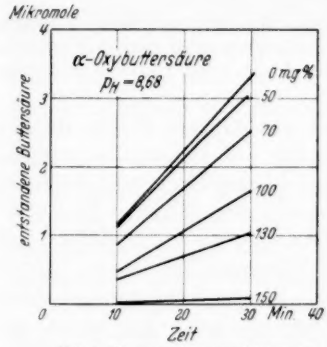


Abb. 5. Wirkung der verschiedenen α-Oxybuttersäurekonzentrationen auf die Meerschweinchenlipase. Verdünnung 1 : 300.

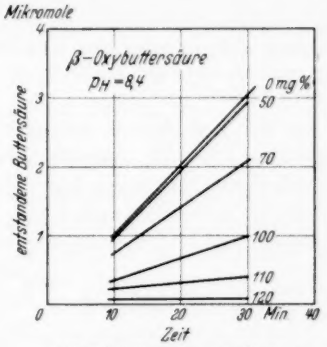


Abb. 6. Wirkung der verschiedenen β-Oxybuttersäurekonzentrationen auf die Meerschweinchenlipase. Verdünnung 1 : 300.

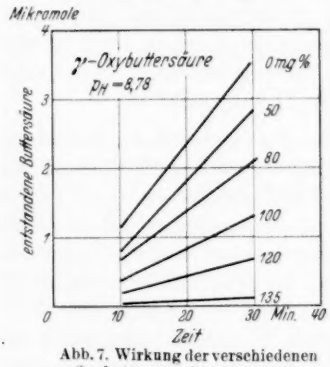


Abb. 7. Wirkung der verschiedenen γ-Oxybuttersäurekonzentrationen auf die Meerschweinchenlipase. Verdünnung 1 : 300.

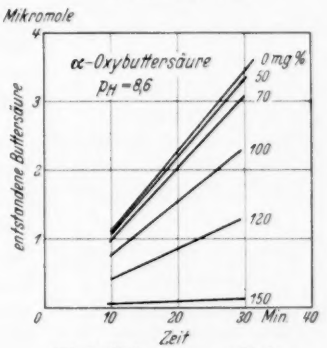


Abb. 8. Wirkung der verschiedenen α-Oxybuttersäurekonzentrationen auf die menschliche Serumlipase. Verdünnung 1 : 30.

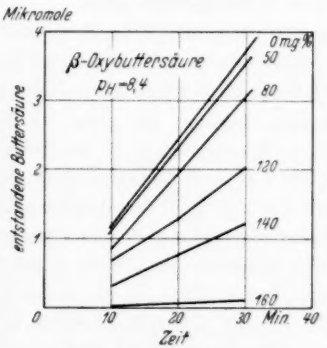


Abb. 9. Wirkung der verschiedenen β-Oxybuttersäurekonzentrationen auf die menschliche Serumlipase. Verdünnung 1 : 30.

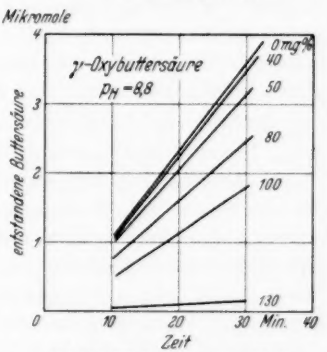


Abb. 10. Wirkung der verschiedenen γ-Oxybuttersäurekonzentrationen auf die menschliche Serumlipase. Verdünnung 1 : 30.

Tributyrinlösung und 0,1 ccm entsprechend konzentrierte, mit n/10 NaOH neutralisierte Oxybuttersäure. Die obige Mischung wird zum Hauptraum zugegossen, in welchem sich 2,7 ccm eines 1 : 30 oder 1 : 300 verdünnten Serums befinden.

Aus den Ergebnissen, besonders aus Abb. 11, geht hervor, daß die γ-Oxybuttersäure die stärkste Giftwirkung auf Menschenserumlipase hat. Schon eine Menge von 50 mg-% bewirkt eine Hemmung von 10 %, und 130 mg-% hemmen vollständig. Am wenigsten giftig ist die β-Oxybuttersäure, die in der menschlichen Pathologie die größte Rolle spielt (totale Hemmung bei 160 mg-%); in der Mitte liegt die α-Oxybuttersäure. Menschenserumlipase ist gegen die Giftwirkung etwas wiederstandsfähiger als die Serumlipase des Meerschweinchens. Dieser Unterschied ist bei allen drei Oxybuttersäurearten ausgeprägt, aber besonders deutlich zeigt er sich bei der β-Oxybuttersäure, wie es auch auf Abb. 11 dargestellt ist.

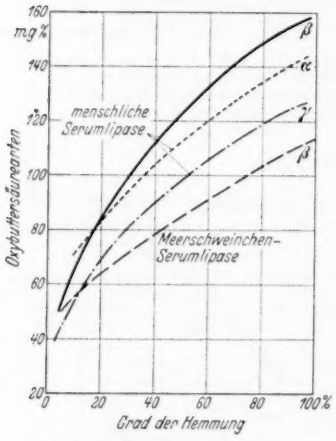


Abb. 11. Hemmung durch verschiedene Oxybuttersäuren.

Für die menschliche Pathologie kann aus unseren Ergebnissen folgendes entnommen werden: Es ist klar, daß das Aceton, welches im Serum Gesunder in einer Konzentration von 2 mg-%, bei Präkomatösen mit 10 bis 15 mg-% und im Serum von Vollkomatösen in einer Konzentration von 20 mg-% vorkommt, in dieser Größenordnung überhaupt keine Giftwirkung ausübt und auch deswegen bei der Stoffwechselstörung Komatöser keine Rolle spielen kann.

Lublin hat mit der Modifikation der *Engfeldt*schen Methode wesentlich höhere Werte gefunden (maximal bis zu 86 mg-%), aber selbst bei so äußerst hohen Werten hat das Aceton in vitro keine Giftwirkung.

Die Giftwirkung der β-Oxybuttersäure beginnt bei etwa 50 bis 80 mg-%. Unter 50 mg-% ist eine sichere Giftwirkung nicht nachweisbar. Nach *Lublin*s Angaben erreicht die isolierte β-Oxybuttersäurefraktion des Blutes beim Vollkoma auch 150 mg-%. Dies scheint aber ein äußerst hoher Wert zu sein, und *Lauersen* findet mit seiner neuen stufenphotometrischen Methode beim Vollkoma auch einen Wert, welcher weit unter dieser Grenze liegt (45 mg-%). Trotzdem ist es als sicher zu betrachten, daß Werte zwischen 50 und 100 mg β-Oxybuttersäure bei schwerster Azidose vorkommen können. In solchen Fällen kommt die Giftwirkung der β-Oxybuttersäure schon bestimmt zur Geltung. Es

scheint, daß die Giftwirkung der β-Oxybuttersäure nicht mit dem Säurecharakter dieser Substanz zusammenhängt, da wir unsere Versuche mit neutralisierter Buttersäure bei einem um 8 herumliegenden p_H in gepufferter Lösung ausgeführt haben.

Zusammenfassung.

1. Aceton übt in vitro weder auf die Meerschweinchen- noch auf Menschenserumlipase bis zu einer Konzentration von 350 mg-% einen entscheidenden Einfluß aus. Dies gilt auch dann, wenn man Aceton kürzere oder längere Zeit mit der Lipase stehen läßt.

2. α-, β- und γ-Oxybuttersäure sind bei einer Konzentration von 50 mg-% schon giftig. An Menschenserumlipase wirkt die γ-Oxybuttersäure am giftigsten, dann folgt α-Oxybuttersäure, am wenigsten giftig ist die β-Oxybuttersäure. Eine völlige Hemmung stellt sich bei einer Konzentration von 130 bis 160 mg-% ein.

3. Meerschweinchenlipase ist gegen die Buttersäuren empfindlicher als menschliche Serumlipase.

Literatur.

Ehrmann, *Esser* u. *Loewy*, Zeitschr. f. klin. Med. **72**. — *Harpuder* u. *Erbsen*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **46**. — *Rona* u. *Lasnitzki*, diese Zeitschr. **152**, 504, 1924. — *Lublin*, ebenda **133**, 626, 1922. — *Lauersen*, Klin. Wochenschrift 1936.

Über Speichel-Phosphatase.

Von

K. Venkata Giri.

(Department of Biochemistry, Indian Institute of Sience, Bangalore.)

(Eingegangen am 10. Februar 1936.)

Unter den tierischen Phosphatasen sind diejenigen aus Organen am besten untersucht. Verhältnismäßig wenig bekannt ist jedoch über die Natur und das Verhalten von Phosphatasen der Körperflüssigkeiten. Das Studium von Änderungen im Phosphatasegehalt der Körperorgane und -flüssigkeiten dürfte ein Licht auf die Rolle werfen, welche diese Enzyme im Stoffwechsel spielen, wie dies durch die Arbeiten von *Kay* (1) und *Bodansky* (2) und andere ähnliche Forschungen mit Plasmaphosphatase erwiesen ist. Im Hinblick auf die wichtige Rolle, welche diese Enzyme im Körper spielen, und wegen der Unzulänglichkeit unseres Wissens über die Phosphatasen der Körperflüssigkeiten wurde die vorliegende Untersuchung an der Speichelphosphatase vorgenommen.

Demuth (3) hat gefunden, daß ein Hexosediphosphat hydrolysierendes Enzym in geringer Menge im Speichel von Erwachsenen vorkommt. Andererseits hat *Umeno* (4) berichtet, daß Speichel frei von Phosphatase sei. Abgesehen von den Ergebnissen der erwähnten Forscher hat das Enzym seit seiner Entdeckung nur wenig Beachtung gefunden. Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, das Vorhandensein einer Phosphatase im Speichel endgültig festzustellen und ihre Eigenschaften und ihr Verhalten zu studieren, unter besonderer Berücksichtigung der Frage ihrer Identität mit anderen Phosphatasen.

Experimentelles.

Es wurde gefunden, daß eine Phosphatase im Speichel von Erwachsenen und Kindern vorkommt. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Speichel von Erwachsenen verwendet.

Darstellung des Enzyms: Zur Gewinnung des für die Versuche benötigten Speichels wurde ein kleines Stück reinen Paraffins gekaut; dadurch wird die Sekretion angeregt und der Speichel in einem kleinen Becherglas, welches Toluol enthält, gesammelt. Das so gewonnene Sekret wurde auf das Doppelte seines Volumens verdünnt und zentrifugiert.

Bestimmung der Enzymaktivität: 5 ccm einer 2,0 %igen Lösung von Natriumglycerophosphat (β-Na-glycerophosphoricum cryst. Merck) wurden zu 10 ccm Pufferlösung gegeben (0,2 n Acetatpuffer oder Veronalacetatpuffer von *Michaelis*). Dazu wurde die Substanz, deren Gehalt an Phosphatase zu prüfen ist, hinzugefügt und das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung auf 25 ccm gebracht. Die Hydrolyse wurde bei 37° C ausgeführt.

Das freiwerdende Phosphat wurde kolorimetrisch nach *Fiske* und *Subbarow* (5) bestimmt, und zwar nach Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure. Das p_H des Reaktionsgemisches wurde kolorimetrisch bestimmt. Eine meßbare Änderung des p_H-Wertes wurde während der Reaktion nicht beobachtet. Die Aktivität wird ausgedrückt in mg Phosphor, welcher nach 24 Stunden bei 37° in der Gesamtmenge (25 ccm) des Reaktionsgemisches freigemacht wird.

Puffer: Für den sauren Bereich wurde Acetatpuffer und für den alkalischen Veronalpuffer nach *Michaelis* verwendet. Das p_H sämtlicher Lösungen wurde eingestellt, bevor diese zu dem Reaktionsgemisch vereint wurden.

Substrate: Als Substrat wurden kristallisiertes β-Na-Glycerophosphat (*Merck*) und Na-Hexosediphosphat benutzt.

Die Lösung von Na-Hexosediphosphat wurde aus reinem Ca-Hexosediphosphat (British Drug Houses, Ltd.) durch Umsetzung mit Natriumoxalat hergestellt.

1. Wasserstoffionenkonzentration und Aktivität.

Tabelle I zeigt die Änderung der Spaltbarkeit von Na-Glycerophosphat und Na-Hexosediphosphat durch Speichel bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. Von p_H 4,0 bis 5,0 zeigt die Phosphatase ein Maximum der Aktivität bei der Hydrolyse von Glycerophosphat. Bei weniger saurer Reaktion nimmt die Aktivität ganz plötzlich ab und erreicht einen meist zu vernachlässigenden Wert bei p_H-Werten nahe dem Neutralpunkt. Für die Hydrolyse von Na-Hexosediphosphat jedoch liegt die optimale Aktivität der Phosphatase ungefähr bei p_H 7,0, eine Beobachtung, welche übereinstimmt mit den Befunden von *Demuth* (3), der das p_H-Optimum der Hexosediphosphat-hydrolyse bei p_H 7,2 liegend fand.

Diese Versuche zeigen, daß Speichel ausschließlich eine saure Glycerophosphatase enthält, deren Optimum bei p_H 4 bis 5 liegt.

Tabelle I. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Hydrolyse von Na-Glycerophosphat und Na-Hexosediphosphat durch Speichelphosphatase.

Na-Glycerophosphat		Na-Hexose-diphosphat	
p_H	Aktivität mg P im Gesamtvolumen (25 ccm) des Reaktionsgemisches	p_H	Aktivität mg P im Gesamtvolumen (25 ccm) des Reaktionsgemisches
3,2	0,080	4,0	0,048
3,8	0,161	5,0	0,095
4,0	0,233	5,5	0,175
4,8	0,233	6,0	0,460
5,0	0,233	6,5	0,460
5,8	0,176	7,0	0,470
6,4	0,126	8,0	0,255
7,0	0,070		
7,8	0,070		
9,0	0,065		
10,6	0,048		

2. Einfluß von Magnesium auf die Aktivität der Phosphatase.

Es hat sich eindeutig erwiesen, daß Mg-Ionen einen Aktivierungseffekt auf die meisten tierischen Phosphatasen, welche bisher untersucht

sind, ausüben, namentlich auf diejenigen der Niere, der Darmschleimhaut, der Knochen, der Leber, der roten Blutkörperchen und des Blutplasmas. Dagegen haben die neuen Befunde von *Bamann* und *Diederichs* (6) gezeigt, daß die saueren Phosphatasen der Organe durch Mg-Ionen nicht aktivierbar sind. Hinsichtlich der Phosphatasen der Körperflüssigkeiten hat *Kutscher* (7) gezeigt, daß Urinphosphatase durch Mg-Ionen in $^1/_{100}$ und $^1/_{200}$ molarer Konzentration nicht aktiviert wird. Auch die vorliegende Arbeit über die Speichelphosphatase führt zu demselben Ergebnis, nämlich, daß Mg-Ionen keinen aktivierenden Einfluß in Konzentrationen von 0,0004 bis 0,001 mol. auf das Enzym ausüben, während höhere Konzentrationen von Mg (0,002 bis 0,1 mol.) deutlich die Aktivität des Enzyms hemmen. Die Ergebnisse der Tabelle II zeigen ferner, daß Mg einen sehr geringen Aktivierungseffekt auf das Enzym bei p_H 8,5 ausübt. Man findet, daß sowohl dialysierte wie nicht dialysierte Präparate von Phosphatase sich gegenüber Mg-Ionen ähnlich verhalten. Diese Ergebnisse deuten auf eine nahe Verwandtschaft zwischen den Phosphatasen des Urins und des Speichels hin.

Tabelle II. Hemmung der Aktivität von Speichelphosphatase durch Mg-Ionen.

p_H	Mg mol.	Aktivität nach 24 Std. Hydrolyse	Aktivität nach 48 Std. Hydrolyse	p_H	Mg mol.	Aktivität nach 48 Std. Hydrolyse
5,0	0,0	0,208	0,415	8,5	0,0	0,125
	0,0004	0,208	0,415		0,0004	0,125
	0,001	0,208	0,415		0,001	0,125
	0,002	0,208	0,385		0,002	0,125
	0,04	0,193	0,312		0,04	0,140
	0,10	0,160	0,262		0,10	0,140

3. Reinigung der Speichelphosphatase durch Dialyse.

Speichel wurde zentrifugiert und dialysiert. Zu den Versuchen wurden Dialysierhülsen von *Schleicher & Schüll* verwendet. Es wurde stets ein Parallelversuch mit einer Enzymlösung, welche – ohne dialysiert zu werden – bei Zimmertemperatur gehalten wurde, ausgeführt. Beide Enzymlösungen wurden auf dieselbe Verdünnung gebracht und ihre Aktivität in Zeitabständen bestimmt und verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle III dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität der Phosphatase während der Dialyse abnimmt und dann meist konstant bleibt. Die Phosphatase der nicht dialysierten Enzymlösung andererseits verliert ihre Aktivität unter ähnlichen Bedingungen und wird nach viertägigem Stehen bei Zimmertemperatur völlig inaktiv. Diese Befunde dürften darauf hinweisen, daß möglicherweise ein Paralysator im Speichel vorhanden ist, welcher die Phosphatase inaktiviert. Bei der Dialyse wird dieser Para-

Tabelle III.

Dialysiert		Nicht dialysiert	
Dauer der Dialyse Std.	Aktivität	Zeit bei Zimmertemperatur Std.	Aktivität
0	0,286	0	0,286
24	0,225	24	0,250
48	0,237	48	0,107
72	0,237	72	0,025
96	0,237	96	0,0

lysator entfernt und das Enzym wird sehr stabil gefunden: Es wurde beobachtet, daß die Aktivität des dialysierten Präparates sogar nach 15tägigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur unverändert blieb.

4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Speichelphosphatase.

Die Wirkung der Steigerung der Konzentration des Glycerophosphats auf die Aktivität der Speichelphosphatase wird in Tabelle IV gezeigt. Der Versuch wurde bei 37° C ausgeführt mit 0,2 mol. Acetatpuffer bei p_H 5,0.

Tabelle IV.

Substratkonzentration in %	Aktivität	Substratkonzentration in %	Aktivität
0,66	0,355	5,4	0,525
1,3	0,473	8,0	0,510
2,7	0,500	13,0	0,257

Die optimale Konzentration von Glycerophosphat für die Aktivität der Speichelphosphatase ist, wie man sieht, 5,4 bis 8,0 %. Die optimale Aktivität der Urinphosphatase [*Dmochowski* und *Assenhajm* (8)] und der saueren Gehirnphosphatase (9) wurde bei einer Konzentration von rund 8,0 % Glycerophosphat gefunden. Andererseits liegen die optimalen Substratkonzentrationen für die Aktivität von alkalischen Phosphatasen der Organe, wie Niere [*Kay* (10)] und Gehirn, bei 0,025 bzw. 0,032 (1 %) molarer Lösung. Demnach scheint die Affinität der Speichelphosphatase bei der Hydrolyse von Glycerophosphat derjenigen der Urin- und der saueren Gehirnphosphatase gleich zu sein und beträchtlich geringer als die der alkalischen Phosphatase von Niere und Gehirn.

5. Hydrolyse verschiedener Phosphorsäureester durch Speichelphosphatase.

Weiterhin wurde die hydrolytische Wirksamkeit der Speichelphosphatase auf verschiedene Substrate untersucht. In jedem Versuch ließ man das Enzym auf eine Menge von Ester einwirken, welche 10 mg Phosphor äquivalent war, bei 35° C und bei dem p_H-Optimum des betreffenden Enzyms (p_H 5,0 bei der Spaltung von Glycerophosphat und p_H 7,0 bei der Spaltung von Na-Hexosediphosphat). Der gesamte Phosphor wurde nach der Methode von *King* (11) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle V angegeben.

Tabelle V.

Substrat	Aktivität
β-Na-Glycerophosphat . .	0,204
Na-Hexosediphosphat . .	0,380

Man ersieht aus der Tabelle, daß Na-Hexosediphosphat viel leichter hydrolysierbar ist als Na-Glycerophosphat.

Zusammenfassung.

1. Speichel von Erwachsenen und Kindern enthält eine Phosphatase, welche Na-Glycerophosphat und Na-Hexosediphosphat hydrolysiert.

2. Das p_H-Optimum der Phosphatase liegt bei p_H 4,0 bis 5,0 für die Hydrolyse von Na-Glycerophosphat und bei p_H 7,0 für die Hydrolyse von Na-Hexosediphosphat.

3. Die Speichelphosphatase verliert ihre Aktivität bei der Dialyse nicht erheblich. Das dialysierte Enzym ist haltbarer als das nicht dialysierte.

4. Magnesiumion aktiviert die Phosphatase nicht bei p_H 5,0 und hemmt die Aktivität bei hohen Konzentrationen. Bei p_H 8,5 scheint eine schwache Aktivierung in Gegenwart von Magnesium stattzufinden.

5. Die Speichelphosphatase ist als identisch mit der Urinphosphatase anzusehen. Anscheinend sind sauere Phosphatasen typisch für Körperflüssigkeiten und Sekrete.

6. Na-Hexosediphosphat wird durch Speichelphosphatase viel leichter hydrolysiert als Na-Glycerophosphat.

Der Autor ist Herrn Prof. *V. Subrahmanyan*, D. Sc., F. I. C., für dessen reges Interesse an dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Literatur.

1) *Kay*, J. of biol. Chem. **89**, 249, 1930. — 2) *Bodansky*, ebenda **104**, 473, 717, 1934. — 3) *Demuth*, diese Zeitschr. **159**, 415, 1925. — 4) *Umeno*, ebenda **231**, 346, 1931. — 5) *Fiske* u. *Subbarow*, J. of biol. Chem. **66**, 375, 1925. — 6) *Bamann* u. *Diederichs*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **67**, 2019, 1934. — 7) *Kutscher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **235**, 62, 1935. — 8) *Dmochowski* u. *Assenhajm*, Naturwiss. **26**/**28**, 501, 1935. — 9) Unveröffentlichte Arbeit des Autors. — 10) *Kay*, Biochem. J. **20**, 791, 1926. — 11) *King*, ebenda **26**, 292, 1932.

Physikalische Versuche zum Problem der mitogenetischen Strahlung.

Von

H. Barth.

(Nach einem im Physikalischen Institut der Universität Moskau am 3. November 1935 gehaltenen Seminarvortrag.)

(Eingegangen am 25. Februar 1936.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Die Möglichkeit des physikalischen Nachweises mitogenetischer Strahlung ist noch sehr umstritten.

Während *Rajewski*[1], *Frank* und *Rodionow*[2], *Siebert* und *Seffert*[3], *Audubert* und *Van Doormaal*[4] über positive Ergebnisse berichteten, ist auf der anderen Seite eine Anzahl von Arbeiten erschienen, welche die Möglichkeit eines solchen Nachweises in Abrede stellen; sie deuten die anders lautenden Berichte als Irrtümer, verursacht durch zu kleines Zahlenmaterial und ungenügend kontrollierte Versuchsbedingungen. In den letzten Jahren wurde namentlich von *Gray* und *Oullet*[5], *Kreuchen* und *Batemann*[6] und *Lorenz*[7] die Ansicht vertreten, daß die als Wirkung mitogenetischer Strahlung auf Lichtzählrohre gedeuteten Resultate infolge einer anderweitigen Beeinflussung der benutzten Meßgeräte durch Dämpfe aus den biologischen Strahlungsquellen oder durch elektrostatische Felder zustandegekommen seien. Unsere eigenen Versuche hatten, wie seinerzeit berichtet wurde[8], positive Einwirkungen auf Lichtzählrohre ergeben, die nicht als zufällige statistische Schwankungen deutbar sind. Da die Abwesenheit der anderen eben erwähnten Fehlerquellen dabei durch eine große Zahl von Kontrollversuchen geprüft worden war, konnten

[1] *B. Rajewsky*, Zehn Jahre Forschung auf dem physik.-med. Grenzgebiet (herausgegeben von Thieme, Leipzig 1930, S. 244). — [2] *G. Frank* u. *S. F. Rodionow*, diese Zeitschr. **260**, 232, 1923. — [3] *W. W. Siebert* u. *H. Seffert*, Naturwiss. **21**, 193, 1933; Arch. Biol. Nauk, Leningrad **35**, 177, 1934. — [4] *R. Audubert* u. *Van Doormaal*, C. r. **196**, 1883, 1933. — [5] *J. Gray* u. *C. Ouellet*, Proc. Roy. Soc. (B) **114**, 1, 1933. — [6] *H. Kreuchen* u. *J. B. Batemann*, Protoplasma **22**, 234, 1934. — [7] *J. Lorenz*, J. Gen. Physiol. **17**, 843, 1934. — [8] *H. Barth*, Arch. Sci. Biol. Med. Exp. (Leningrad) **35**, 29, 1934. — Zusatz bei der Korrektur: In letzter Zeit wurde von *Levy* und *Audubert* (Protoplasma Februar 1936) mit dem Lichtzähler eine Strahlung vom gleichen Wellenlängenbereich bei der Teilung von Discoglossus und am erregten Nerven nachgewiesen. Die Ergebnisse stimmen auch in den Einzelheiten gut mit Resultaten überein, die seinerzeit mit biologischen Detektoren erhalten worden waren (*A. Gurwitsch*, Die mitogenetische Strahlung 1932. Amphibieneier: S. 100, Nerv: S. 164 und mehrere Arbeiten in Pflügers Archiv). Wir müssen sie daher im Sinne der vorliegenden Betrachtung zu den „positiv" lautenden Befunden rechnen, wenngleich die Bezeichnung „mitogenetische" Strahlung, deren Berechtigung im streng wörtlichen Sinne natürlich mit dem Zählrohr nicht geprüft werden kann, dort ausdrücklich abgelehnt wird.

wir uns die Ergebnisse nur als Wirkung einer von den untersuchten Präparaten ausgehenden Ultraviolettstrahlung erklären.

Es erschien deshalb interessant, die Versuche in engerer Zusammenarbeit mit der mitogenetischen Schule fortzusetzen[1].

Im Verlauf dieser Untersuchungen ergab sich die physikalische Nachweisbarkeit der mitogenetischen Strahlung. Über die Resultate sowie über die Herstellung der benutzten Zählrohre soll im zweiten und dritten Teil Näheres berichtet werden.

Erster Teil. Zum gegenwärtigen Stand des Problems.

§ 1. Die Lichtempfindlichkeit der benutzten Meßgeräte.

Die Hauptschwierigkeit für die Beurteilung der Brauchbarkeit der bisherigen Ergebnisse ist folgende: Auf Grund der gemessenen Lichtempfindlichkeit von Zählrohren, mit denen eine mitogenetische Strahlung nicht festgestellt werden konnte, wird entweder überhaupt die Meßbarkeit solcher Strahlungserscheinungen bestritten, oder es werden doch für deren Höchstenergie so niedrige Grenzen festgelegt, daß damit eine physikalische Deutung der Befunde auf außerordentliche Schwierigkeiten stößt. Die Zuverlässigkeit der Empfindlichkeitsmessungen ist gelegentlich diskutiert worden. Es wurde aber unseres Wissens noch nicht auf die Tatsache hingewiesen, daß für den in der strittigen Frage wesentlichsten Wellenlängenbereich solche Messungen noch gar nicht ausgeführt worden sind.

Von den Biologen wird für die mitogenetischen Strahlungserscheinungen der Wellenlängenbereich von etwa 2500 Å abwärts bis zur unteren Grenze der mit den benutzten Spektrographen erreichbaren Wellenlängen, d. h. ungefähr 1800 Å, angegeben. Die Elektronenausbeute der zu den physikalischen Messungen benutzten Zählrohre steigt in diesem Gebiet meist um mehrere Zehnerpotenzen nach kürzeren Wellenlängen hin an, und es ist fraglich, ob die für einige Metalle um 2200 Å anzunehmenden selektiven Maxima so ausgeprägt waren, daß sie zugleich als Stellen der höchsten Zählerempfindlichkeit anzusehen sind.

Da die Versuche mit mitogenetischen Strahlern stets nur kleine Effekte ergaben, spricht also alles dafür, daß dabei höchstens Wellenlängen unterhalb 2200 Å wirksam gewesen sein können. Die kleinste Wellenlänge, bei welcher Zählerempfindlichkeiten gemessen wurden, beträgt dagegen bei *Rajewski* 2650 Å, *Friedrich* und *Schreiber* 2660 Å, *Frank* und *Rodionow* 2537 Å, *Gray* und *Ouellet* 2500 Å, *Lorenz* 2300 Å, *Kreuchen* und *Batemann* 2537 Å. Angesichts der Unmöglichkeit, diese Messungen auf die kürzeren Wellenlängen zu extrapolieren, sagen sie also nichts darüber aus, welche Zählgeräte im mitogenetischen Gebiet die empfindlichsten sind.

[1] Diese Versuche wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. *Gurwitsch* in dessen Institut durchgeführt.

So ergab beispielsweise ein Vergleich der Empfindlichkeiten eines Zählers mit Aluminiumkathode und eines anderen mit Jodsilberkathode, daß bei 2100 Å die Lichtempfindlichkeit beider Zählgeräte annähernd gleich war, während bei 2500 Å das Jodsilberrohr (mit dem die Ergebnisse der Tabelle VIII im 2. Teil dieser Arbeit erhalten wurden), bereits 1000mal unempfindlicher war als der Aluminiumzähler. Die mit Jodsilberrohren registrierten Einwirkungen sind trotzdem von derselben Größenordnung wie die mit der gleichen Strahlungsquelle erhaltenen Resultate bei Aluminiumrohren.

Ähnliche Schwierigkeiten wie für den Vergleich der benutzten Zählröhre ergeben sich für die Frage nach deren Empfindlichkeit im absoluten Maß und damit auch für die Frage nach der Intensität der mitogenetischen Strahlung.

Für die Lichtausbeute von Zählrohren, mit denen mitogenetische Strahlung gemessen werden konnte, erhielten *Rajewski* sowie *Frank* und *Rodionow* die außerordentlich hohen Werte von 100 bzw. 1000 Quanten pro Zählstoß. Dagegen stellen *Kreuchen* und *Batemann* an die Spitze ihrer Diskussion über die Eignung des Lichtzählrohres zu mitogenetischen Messungen den Satz, daß solche Angaben auf einer Überschätzung der Zählerempfindlichkeit um Zehnerpotenzen beruhen. Dieser Fehler sei dadurch entstanden, „daß die Eichung der Zählrohre nicht sorgfältig genug durchgeführt wurde, weil der Einfluß von Streuquanten aus Spektralgegenden mit höherer lichtelektrischer Wirksamkeit als bei der Testlinie nicht genügend berücksichtigt wurde". Dazu kommt noch, daß *Kreuchen* und *Batemann* auf Grund ihrer Untersuchungen eigentlich schließen müßten, daß die Empfindlichkeit der Zählrohre für mitogenetische Strahlung nicht über-, sondern sogar unterschätzt wurde: Die Testlinie ist nämlich die am Monochromator eingestellte Linie 2537 Å, mit welcher der Zähler geeicht wurde, und für die Spektralbereiche höherer lichtelektrischer Wirksamkeit steht demnach gerade der biologisch ermittelte Wellenlängenbereich der mitogenetischen Strahlung zur Verfügung. Wenn schon eine Verunreinigung der eigentlich eingestellten Eichlinie durch kleine Beträge gestreuten Lichtes dieser Wellenlängen zu einer so großen Überschätzung der Zählerempfindlichkeit bei 2537 Å geführt hat, so muß die Empfindlichkeit des Zählers jedenfalls für jene Wellenlängen des mitogenetischen Gebietes recht beträchtlich gewesen sein. In diesem Punkt deckt sich also der Mittelwert aus den Ergebnissen der kritischen Untersuchung ungefähr mit den Resultaten der kritisierten Arbeiten.

Die Empfindlichkeit der benutzten Geräte ist auch für solche Untersuchungen wichtig, welche den Beweis der Nichtmeßbarkeit der mitogenetischen Strahlung zum Gegenstand haben. Abgesehen von den Messungen von *Kreuchen* sind jedoch einigermaßen gesicherte Bestimmungen nicht einmal für die obere Grenze des von *Gurwitsch* angegebenen Wellenlängenbereiches vorhanden.

Die Hauptschwierigkeit der Messung besteht wohl darin, daß das mit Thermoelement oder Bolometer in absolutem Maße gemessene Eichlicht um mehr als millionenfache Beträge abgeschwächt werden muß, bevor seine Wirkung auf den Lichtzähler bestimmt werden kann. Wie viele Fehlerquellen solchen Methoden anhaften und welcher Kontrollen sie bedürfen, zeigt die Literatur über Spektralphotometrie. Als Licht-

schwächungsmittel für die Zählereichungen kamen zur Anwendung: teilweise geschwärzte photographische Platten, deren Abschwächungsfaktor von der Wellenlänge des Lichtes und außerdem — wegen der Lichtzerstreuung an den Silberkörnern — sehr davon abhängig ist, in welcher Weise die Platten im Strahlengang Verwendung finden; ferner Flüssigkeitsfilter, bei denen bekanntlich die Konstanz und die Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes geprüft werden muß, endlich kalibrierte Spalte in Kombination mit nur einmal spektral zerlegtem Licht. Die Anwendbarkeit dieser Methoden bei so hohen Abschwächungsbeträgen bedarf jedoch in jedem Falle zuvor einer eingehenden Prüfung. Da eine Zusammenstellung der angewandten Verfahren und der hauptsächlichsten gegen sie bestehenden Bedenken kürzlich von *Hollaender*[1] gebracht wurde, kann hier auf eine Besprechung im einzelnen verzichtet werden. Leider werden gerade bei diesen Messungen meist fast keine Einzelheiten, geschweige denn Kontrollen über die Richtigkeit der Resultate gebracht, und merkwürdigerweise ist die Kürze der Darstellung im allgemeinen umgekehrt proportional der Ausführlichkeit, die von den angezweifelten mitogenetischen Arbeiten gefordert wird.

Es fehlt demnach noch jede sichere Grundlage für die Beantwortung der Frage, welche Intensität der mitogenetischen Strahlung auf Grund der physikalischen Versuchsergebnisse zugeschrieben werden könnte. Noch viel weniger jedoch liegen Empfindlichkeitsbestimmungen an Zählrohren vor, auf Grund deren die Möglichkeit eines physikalischen Nachweises solcher Strahlung bezweifelt werden müßte.

Auch die Berechnung von Zeiten, innerhalb deren photographische Platten von der Strahlung merklich geschwärzt werden müßten, dürfte schon deshalb nicht möglich sein, weil es nicht sicher ist, ob der photographische Prozeß so geringe Intensitäten noch zu summieren vermag.

Dagegen müssen wir uns noch mit den Fehlerquellen befassen, die in letzter Zeit von einigen Seiten für das Zustandekommen der als mitogenetische Strahlung gedeuteten Einwirkungen auf Lichtzählrohre verantwortlich gemacht wurden.

§ 2. Zu den Fehlerquellen bei Messungen mit dem Zählrohr.

Von *Gray* und *Ouellet* wurde die Beobachtung gemacht, daß sich die von ihrer Zählapparatur registrierte Stoßzahl gleichzeitig mit der Luftfeuchtigkeit des Versuchsraumes ändert. Ähnliche Wirkungen auf das Zählrohr erhielten diese Verfasser, wenn organische Präparate, z. B. Zwiebelwurzeln, untersucht wurden, deren Annäherung an den Zähler eine Erhöhung der Stoßzahl um etwa 50 % bewirkte. Wurden Zähler und Präparat in einem Exsikkator untergebracht, so blieb dagegen die Entladungszahl konstant. Die ursprünglich erhaltenen Ergebnisse beruhten demnach nicht auf mitogenetischer Strahlung, sondern auf Störung der Apparatur durch den Wasserdampfgehalt der Luft. *Lorenz* berichtet über ähnliche Störungen seines Zählgerätes durch elektrische Felder, die im Innern des Zählrohres eine Erhöhung der spontanen Entladungszahl bewirkten. Insbesondere

[1] *A. Hollaender* u. *W. Claus*, J. of the Opt. Soc. Amer. **25**, 270, 1935.

vor das Zählerfenster gebrachte geriebene Quarz- und Glasteile rufen gleiche Effekte hervor wie sie von anderen Autoren als Strahlungseffekte gedeutet wurden. War das Zählrohr in geeigneter Weise gegen solche Einflüsse geschützt, so konnte eine Einwirkung mitogenetischer Präparate gleichfalls nicht mehr festgestellt werden. *Kreuchen* und *Batemann* zeigen an Hand einiger Abbildungen, daß die Streuung ihrer Meßpunkte ebenfalls geringer wird, wenn sie das Zählrohr in einem besonders konstruierten Schutzgehäuse unterbringen.

Angesichts dieser Tatsachen scheint es fraglich, ob damit nicht die Berichte über mitogenetische Messungen mit dem Zählrohr endgültig ad absurdum geführt sind. Man darf diese Annahme jedoch nicht allzusehr verallgemeinern:

Abstände des Präparats von dem Zählerfenster, wie sie *Lorenz* selbst als ausreichend für elektrostatischen Schutz bezeichnet, sind bald teilweise, bald stets vorhanden und zahlenmäßig angegeben worden. Bei *Frank* und

Abb. 1. Querschnitt des Zählrohrs von *Lorenz*. Quarzrohr mit Metallbelag auf der Innenseite als Kathode. Der flachgedrückte Teil bleibt durchsichtig und dient als Fenster.

Rodionow konnte bei Versuchen mit der Eisenoxydationsreaktion sogar ein Monochromator zwischen Strahlungsquelle und Zählrohr eingeschaltet werden.

Frank und *Rodionow* sowie ich selbst konnten feststellen, daß das Ansprechen eines Zählrohres auf mitogenetische Präparate eine typische Eigenschaft der Kathodenoberfläche ist. Das steht natürlich mit der Annahme einer elektrischen oder hygroskopischen Beeinflussung vom Präparat her völlig im Widerspruch.

Die Tabelle V meiner ersten Veröffentlichung zeigt z. B. an einem großen Versuchsmaterial, daß es bei meiner Apparatur völlig gleichgültig war, ob während der Zählungen ein Gefäß mit Wasser vor dem Zählerfenster stand oder nicht. Die Ergebnisse meiner übrigen Tabellen zeigten, daß Effekte erhalten wurden unabhängig davon, ob mit Quarzgefäßen oder freien Oberflächen gearbeitet wurde, und ob zu den Kontrollzählungen Glasplatten zwischengeschaltet, oder die Strahlungsquelle entfernt, oder ob diese mit einer Kontrollküvette vertauscht wurde. Daß die Zeitkurven den für den Ablauf der Reaktion typischen Verlauf zeigten, ist ebenfalls ein Argument dafür, daß derartige Fehlerquellen hier nicht im Spiele gewesen sein können. Im übrigen muß man berücksichtigen, daß es sich bei den vermuteten Einflüssen um typische Nachteile derjenigen Meßgeräte handelt, bei denen die Beobachtung dieser Dinge im Vordergrund stand. Bei *Kreuchen* und *Batemann* beträgt z. B. der Ableitwiderstand 10^{10} Ohm und es wird beobachtet, daß unter Feuchtigkeitseinflüssen der Isolationswiderstand des Zählers selbst auf die gleiche Größe sinkt, was zu Störungen Anlaß gibt. Dabei darf jedoch nicht vergessen werden, daß die gleiche Fehlerquelle bei einer anderen Apparatur, deren Ableitwiderstand etwa 10^8 bis 10^9 Ohm beträgt, zehnmal bzw. hundertmal kleiner ist. Da zudem die Oberflächenbeschaffenheit verschiedener Gläser und sonstiger Isolatoren denkbar ver-

schieden ist, erscheint es möglich, daß anders gebaute Apparaturen nicht in gleichem Maße eines besonderen Schutzes bedürfen. Daß das Rohr von *Lorenz* für elektrische Störungen besonders prädestiniert ist, ersieht man aus dem Querschnitt des in Abb. 1 skizzierten Rohres. Der Einfluß von Ladungsänderungen an der Innenseite des Fensters oder unmittelbar vor demselben auf die Feldverteilung im Innern ist bei derartiger Konstruktion ganz besonders groß. Wir selbst konnten bei unseren Vorversuchen Ähnliches beobachten und wählten daher den Rohrquerschnitt der Abb. 2, da sich zeigte, daß elektrische Einflüsse der benutzten Versuchsobjekte in diesem Falle vermieden werden konnten (vgl. 2. Teil, § 2). Auch der bei *Kreuchen* und *Batemann* (S. 252) beschriebene Versuch ist keine Widerlegung der

Abb. 2. Querschnitt unserer Zählrohre. Geschlitztes Metallrohr konzentrisch in einem Quarzrohr vom doppelten Durchmesser.

gleichartigen Versuche von *Frank* und *Rodionow*. Es hat vielfach zu Mißverständnissen Anlaß gegeben, daß der Ordinatenmaßstab der von *Kreuchen* und *Batemann* gezeichneten Abb. 6 mit der Stoßzahl 15 beginnt, so daß es sich bei flüchtigem Hinsehen bei den *Frank*schen Kurven (deren Ordinaten mit Null beginnen) um ein gleichartiges Ergebnis zu handeln scheint. Tatsächlich zeigen aber die Kurven von *Kreuchen* und *Batemann* bei elektrischer Reizung des Froschmuskels eine kleine mittlere Vermehrung der Zählerstöße um etwa 25%, während sich bei *Frank* und *Rodionow* die Mittelwerte der einzelnen Meßreihen zwischen 60 und 230% bewegen. Da *Frank* und *Rodionow* ausführlich beschreiben und durch ein Zahlenbeispiel die Prüfung ihrer Apparatur (durch Kontrollversuche mit narkotisierten Muskeln und feuchten Papierstreifen) auf die Abwesenheit von elektrischen Störungen belegen, ist es nicht wahrscheinlich, daß ihnen größere Störungseffekte entgangen sind. Andererseits ist es nicht sehr überzeugend, wie *Kreuchen* und *Batemann* nachzuweisen suchen, daß ihre Effekte durch Störungen und nicht durch Strahlung verursacht worden seien: Zwischen Zähler und Präparat wird ein Filtergerät eingeschaltet, bestehend aus einem Lichtfilter, einer Quarzplatte und einem Drahtnetz. Aus Gründen der Reflexion an Quarzplatte und Lichtfilter muß dabei ein Lichtverlust von mindestens 20% eintreten, und zuzüglich der Absorption durch Filtersubstanz und Drahtnetz erscheint eine Lichtschwächung bis etwa 50% durchaus möglich. Ist die gemessene Differenz der Stoßzahlen bei gereiztem und ungereiztem Muskel durch ultraviolette Strahlung hervorgerufen, so beträgt sie nach Vorsatz des Schutzgerätes vielleicht noch etwas über 10% des Dunkeleffektes, ein Betrag, der jedenfalls nur durch lange Versuchsreihen statistisch gesichert und seinerseits wieder von Störungen unterscheidbar wäre; ein überzeugender Unterschied gegenüber der mit dem Vorsatzgerät gemessenen Kontrollkurve wäre also auch für diesen Fall nicht zu erwarten. Es erscheint daher nicht sicher, ob es sich bei der beseitigten Störung nicht doch um Strahlung gehandelt hat, zumal die jedenfalls viel bessere Kontrolle nach *Frank* hier fehlt. *Kreuchen* benutzte für diesen Versuch — der als einziger mit ungeschütztem Zähler etwas deutlich Positives zu ergeben scheint — diejenige mitogenetische Quelle, die nach anderweitigen Mitteilungen bei weitem die größten Strahlungseffekte ergab. Auch von biologischer Seite werde ich darauf aufmerksam gemacht, daß bei den

Hefeversuchen der gleichen Arbeit diejenige Serie, welche einen kleinen positiven Effekt anzudeuten scheint (Tabelle III), zugleich die einzige ist, die mit der Arbeitsweise der *Gurwitsch*-Schule einigermaßen vergleichbar ist.

Wir sehen also, daß es bei näherer Betrachtung zu recht gezwungenen Annahmen führen würde, wenn man die neuerdings diskutierten Fehlerquellen schlechthin für alle als mitogenetische Strahlung gedeuteten Befunde verantwortlich machen wollte.

§ 3. Die verwendeten mitogenetischen Strahlungsquellen.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß auch die Verwendung ungeeigneter mitogenetischer Strahlungsquellen in vielen Fällen am Versagen der Versuche schuld sein kann.

Z. B. strahlt Zwiebelsohlenbrei nach seiner Zubereitung 30 Minuten lang mit zeitlich abnehmender Intensität[1]. Nach einer Stunde ist sein Strahlungsvermögen völlig erloschen[2]. *Lorenz* benutzte aber zu photographischen Versuchen Zwiebelsohlenbrei, der nur alle 2 Stunden erneuert wurde. Die Bedenken des Verfassers bezüglich der zeitlichen Konstanz erscheinen also gerechtfertigt. Über das Verhalten von Zwiebelwurzeln in KCl-Lösung, die *Lorenz* zur Sicherung seines Ergebnisses außerdem noch prüfte, dürfte — wenigstens in *Gurwitschs* Veröffentlichungen — noch nichts berichtet sein. „Supposed to be excellent mitogenetic radiators" ist also ersterer etwa im zehnten Teil der angenommenen Belichtungszeit und letztere unter anderen Bedingungen. Von dem für diese Arbeit und zahlreiche andere verwendeten Embryogewebe dürfte nach den biologischen Ergebnissen *keine* Strahlung zu erwarten sein[3]. Mäusecarcinom würde nur bei Zusatz von Glucose längere Zeit strahlen[4]; allerdings ist aus der Arbeit nicht ersichtlich, ob Glucose zugegeben wurde.

Mit Bezugnahme auf die mitogenetischen Arbeiten von *Braunstein* und *Pototzky*[5] über die Strahlung chemischer Reaktionen untersuchten *Gray* und *Ouellet* mit dem Zählrohr fünf Oxydationsreaktionen, die die ersteren nicht geprüft hatten, dagegen keine der vielen Reaktionen, von denen mit biologischen Detektoren Strahlung erhalten worden war. Da *Braunstein* und *Pototzky* angeben, daß sie durchaus nicht bei allen Reaktionen Strahlung fanden, und daß diese unter gewissen Umständen sehr leicht gelöscht wird, ist in diesem Falle wohl auch nicht von einer physikalischen Prüfung mitogenetischer Versuchsergebnisse zu sprechen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß an den Berichten über den physikalischen Nachweis von mitogenetischer Strahlung eine unberechtigt scharfe Kritik geübt worden ist, und daß die Behauptung von der Unmöglichkeit ihres Nachweises mit Lichtzählrohren sich auf Schlußfolgerungen gründet, die einer ähnlich scharfen Kritik viel

---

[1] *A. Gurwitsch*, Die mitogenetische Strahlung 1932, S. 79f. — [2] *A.* u. *L. Gurwitsch*, W. Roux' Arch. f. Entwicklungsmech. 1926. — [3] *A. Gurwitsch*, l. c. S. 101ff. — [4] *A.* u. *L. Gurwitsch*, Zeitschr. f. Krebsforsch. **36**, 320, 1932. — [5] *A. E. Braunstein* u. *A. Pototzky*, diese Zeitschr. **249**, 270, 1932; Arch. d. Sc. biol. **35**, 73, 1934, Leningrad.

weniger standhalten würden. Einer besonderen Untersuchung bedarf noch die Frage der Strahlungsintensität im absoluten Maß. Eine erschöpfende Behandlung *beider* Fragen würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit weit übersteigen. Wir wollen daher im folgenden nur einige Ergebnisse bringen, die uns auf ersterem Gebiet wesentliche Beiträge darzustellen scheinen.

Zweiter Teil. Physikalische Versuche mit mitogenetischen Strahlungsquellen.

§ 1. Versuchsanordnung.

Die Schaltung unserer Zählrohre war die allgemein gebräuchliche, so daß sich eine Aufzeichnung erübrigt. Als Spannungsquelle benutzten wir, um möglichst große Konstanz zu erzielen, ausschließlich eine Hochspannungsbatterie von etwa 1500 Volt Maximalspannung, deren Konstanz ständig kontrolliert wurde. Um Störungen der Zählapparatur von außen nach Möglichkeit einzuschränken, wurde von der Benutzung von Verstärkeranordnungen zur Registrierung der Zählerstöße abgesehen und die Entladungen lediglich mit Hilfe des Elektrometers beobachtet. Um trotzdem objektive Versuchsprotokolle herstellen zu können, bauten wir später ein photographisches Registriergerät. Das Blättchen eines *Wulf*schen Elektrometers wurde auf einen Spalt mit Zylinderlinse projiziert, hinter dem sich ein Bromsilberpapierstreifen bewegte, der durch einen kleinen Elektromotor angetrieben wurde. Das Blättchen gab einen breiten Schatten, der im Ruhezustand fast die ganze Breite des lichtempfindlichen Bandes bedeckte und dieses nur für die Belichtung freigab, wenn er durch eine Zählrohrentladung abgelenkt wurde. Auf diese Weise war es leicht zu erreichen, daß auch schnelle Elektrometerbewegungen sicher registriert wurden, selbst wenn wir das Band nur mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 2 mm pro Sekunde abrollen ließen. Da die Entladungszahl unserer Zähler etwa 2 bis 5 pro Minute betrug, erhielten wir bei dieser Bandgeschwindigkeit noch völlig klare Registrierungen. Das Gerät ist so eingerichtet, daß das Elektrometer gleichzeitig mit dem Auge beobachtet werden kann. Die Abweichungen zwischen visueller und photographischer Zählung betrugen auch bei längerer Arbeit nicht über 1%.

§ 2. Form der Zählrohre.

Die im ersten Teil der Arbeit besprochenen Fehlerquellen hatten auch wir bei Vorversuchen mit ungünstig gebauten Zählern gelegentlich beobachten können. Kleine Rohre, deren Isolationsweg zwischen Anode und Kathode auf der Außenseite sehr kurz war, änderten bei Gegenwart von Wasserdampf ihre Stoßzahl merklich, wenn mit großem Ableitwiderstand gearbeitet wurde. Besonders aber waren die inzwischen von *Lorenz* näher studierten Störungen durch elektrische Felder aufgetreten. Wurde die untersuchte Substanz in direkte Berührung mit dem Quarzfenster des Zählers gebracht, so änderte sich die Stoßzahl häufig, wenn sie gegen eine neue Probe oder gegen eine nichtstrahlende Kontrollsubstanz, z. B. Wasser, ausgewechselt wurde. Dies trat auch ein, wenn die Stoffe in leitender Verbindung mit der Erde gehalten wurden. Da aus Gründen der Konstanz bei solchen Manipulationen die Spannung nicht abgeschaltet werden konnte, traten dabei vermutlich Entladungen auf, die den Ladungszustand auf der Innenseite des Quarzfensters änderten. Die Feuchtigkeitseinflüsse konnten

durch geeignete Bauart des Rohres, die zuletzt genannten Störungen durch einen Luftzwischenraum von 0,5 bis 1 cm zwischen Präparat und Zählerfenster vermieden werden. Die Stoßzahl unserer Zählrohre erhöhte sich zwar um etwa 50 %, wenn durch Reiben stark elektrisierte Quarzplatten dicht vor das Eintrittsfenster gebracht wurden, bei den mitogenetischen Versuchen ließ sich jedoch das Auftreten ähnlich starker Ladungen leicht verhindern und ihre Abwesenheit durch Kontrollversuche feststellen. Außerdem war noch folgender Gesichtspunkt für die Formgebung der Rohre maßgebend: Da es darauf ankommt, mit möglichst geringer Strahlungsintensität eine merkliche Erhöhung der Stoßzahl zu erzielen, und da die Dunkelentladungszahl mit den Dimensionen des Zählrohres wächst, muß bei gegebener Lichtquelle die Flächenhelligkeit auf der Kathode möglichst groß gemacht werden. Außerdem soll möglichst im ganzen Raum des Zählrohrs jedes ausgelöste Photoelektron bzw. die größtmögliche Anzahl derselben befähigt sein, eine Stoßentladung anzuregen. Aus diesen Gründen wurden langgestreckte Zylinderrohre von 70 oder 40 mm Länge und 8 bis 10 mm Durchmesser benutzt, die ihrer ganzen Länge nach mit einem Schlitz von 3 bis 4 mm Breite für den Lichteintritt versehen waren. Das ergab geometrisch günstige Verhältnisse für die Lichtausnutzung der Präparate. Die Verteilung der Lichtempfindlichkeit längs der Achse der Rohre ist aus Abb. 3 ersichtlich. Die Kurven zeigen die beobachteten Stoßzahlen, wenn ein scharfbegrenztes Lichtbündel von 3 bzw. 1 mm Breite längs des Schlitzes verschoben wurde. Man sieht, daß an den Rohrenden bis auf eine Strecke von etwa dem einundeinhalbfachen des Rohrdurchmessers ein steiler Abfall besteht, während im übrigen Teil nahezu konstante maximale Ausbeute herrscht.

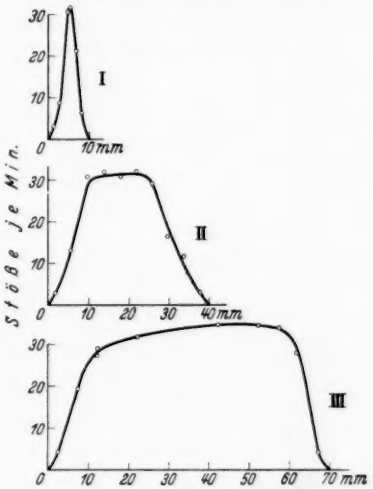


Abb. 3. Verteilung der Lichtempfindlichkeit längs der Achse dreier Zählrohre von 10, 40 und 70 mm Länge nach Messungen von *M. Filippow*.

Möglicherweise spielt die Formgebung der Rohre bei der Frage nach ihrer Eignung für mitogenetische Versuche eine wesentliche Rolle. Das Rohr von *Kreuchen* und *Batemann* z. B., das bei 20 mm Durchmesser nur 20 mm lang ist, dürfte nur einen ganz schmalen Bereich (ähnlich der Kurve I, Abb. 3) maximaler Ausnutzung der lichtelektrischen Eigenschaften der Kathode besitzen und es ist wahrscheinlich, daß der Dunkeleffekt nicht im gleichen Maß verkleinert ist. Durch einen T-förmigen Ansatz ist der Abstand des Quarzfensters vergrößert, was den Lichtweg verlängert und einengt. Der von *Hummel*[1] näher untersuchte und auch von *Rajewski*[2] durch besondere Rohrkonstruktion möglichst klein gehaltene störende Einfluß der

[1] *J. N. Hummel*, Physikal. Zeitschr. **34**, 331, 1933. — [2] *B. Rajewski*, Ann. d. Phys. **20**, 13, 1934.

Ladungen auf den Isolierstopfen regiert hier zudem den Entladungsmechanismus im ganzen Rohrvolumen. — *Seyfert*[1] benutzt ein langgestrecktes Rohr, dessen eines Ende durch ein Quarzfenster verschlossen ist, verteilt also die durch das Fenster eintretende Lichtmenge auf eine sehr große Kathode. — Es ist also anzunehmen, daß bei gleichen Kathodeneigenschaften solche Zählrohrformen wesentlich geringere prozentische Effekte ergeben als die von uns benutzten.

Der Einbau unseres Zählrohrs in den Glasbehälter ist aus Abb. 4 ersichtlich. Ein Schliff (S) gestattet das Gefäß zur Erneuerung der Kathode auseinanderzunehmen. Der eigentliche Zähler (Z) befindet sich in einem unten angekitteten Quarzrohr (Q) mit seitlichem Ansatz zur Durchführung der Kathodenzuleitung. Der äußere Isolationsweg zur Anode ist möglichst lang gemacht und führt über Glas und Quarz. Als Anode diente Stahldraht von 0,2 bis 0,3 mm Durchmesser, der in verdünnter Salpetersäure oxydiert wurde. Er war durch Stopfen aus gutem Hartgummi von der Wandung isoliert. Das Füllgas war meist Luft oder Wasserstoff; auch mit Argon sowie Leuchtgas wurden einige Versuche mit positivem Erfolg gemacht. Zur Trocknung der Gase diente Chlorcalcium. Allzu starke Trocknung erwies sich eher schädlich als nützlich. Bei unseren ersten Versuchen blieben die Zählrohre in ständiger Verbindung mit der Vakuumapparatur; später zeigte sich, daß sie auch wochenlang mit der erforderlichen Konstanz arbeiteten, wenn während einiger Tage nach der Herstellung die Gasfüllung mehrmals erneuert, sodann der Hahn (H) geschlossen und das Rohr von der Apparatur abgenommen wurde.

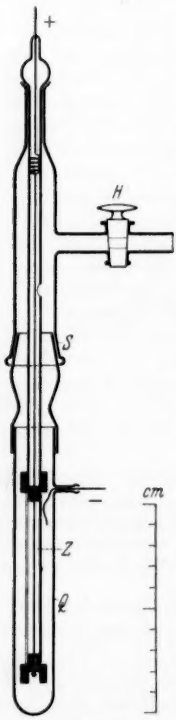


Abb. 4. Aufbau des Zählrohres.

§ 3. Herstellung der Kathoden.

Der schwierigste Teil der Versuche war die Herstellung geeigneter Zählerkathoden. Zur Verwendung gelangten innen blankgeschliffene Rohre aus Kupfer und Aluminium sowie mit Joddämpfen behandelte Kupfer- und Silberrohre.

Die Erzielung blanker Metalloberflächen mit guten Zählereigenschaften gelang am besten durch vorsichtiges Abschleifen mit noch nicht benutztem und möglichst oft gewechseltem Glaspapier. Polierte Flächen zeigten wesentlich geringere Lichtempfindlichkeit. Bei Luftfüllung der Zähler wurden die Aluminiumkathoden nach einigen Stunden, diejenigen aus Kupfer nach einem Tage erneuert. Zwei mit Argon gefüllte Kupferzähler gaben mit mitogenetischen Präparaten je 14 Tage lang positive Effekte ohne Erneuerung der Oberfläche. Ein starkes Ausheizen der Kathode wurde vermieden, da alle unsere Versuche mit solchen Kathoden fehlgeschlagen waren. Es zeigte sich bald (wie früher schon berichtet), daß die Erneuerung der

[1] *F. Seyfert*, Jahrb. wiss. Botan. **76**, 747, 1932.

Oberfläche bei ein und demselben Zählrohr nicht beliebig oft wiederholt werden konnte. Bei den blanken Metalloberflächen traten nach etwa einer Woche meist Störungen im Entladungsmechanismus oder abnorm hohe Dunkelentladungszahlen auf, die weder durch neues Abschleifen noch durch Auswechseln der übrigen Zählerbestandteile behoben werden konnten. Gleichzeitig schlugen alle Versuche fehl, mit solchen Zählern mitogenetische Effekte zu zeigen. Auf die Dauer von einigen Stunden konnte bei solchen Rohren die Empfindlichkeit durch eine Glimmentladung in Wasserstoffatmosphäre wieder gesteigert werden. Ähnlich wirkte elektrolytische Beladung mit Wasserstoff. Dagegen konnte durch Änderung der Methode des Abschleifens der frühere Zustand nicht wieder erzielt werden. Viermal konnten außer Dienst gesetzte Rohre mit Erfolg wieder in Betrieb genommen werden, nachdem sie einen Monat außerhalb des Vakuums gelegen hatten. Da

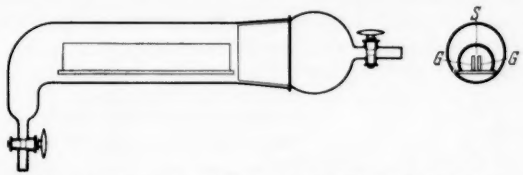


Abb. 5. Anordnung zur Herstellung von Metalljodid-Kathoden.

es bekannt ist, daß die Entgasung von Metallen im Vakuum das erste Mal sehr langsam, bei Wiederholungen jedoch nach kurzer Zeit relativ rasch vor sich geht, kann vielleicht der Gasgehalt der Kathoden bei diesen Alterungserscheinungen, die wir an über 20 Rohren beobachten konnten, eine Rolle spielen. Wir haben aus diesen Gründen die mit solchen Rohren ausgeführten mitogenetischen Versuche der Tabelle IV in der Weise angestellt, daß die Kathode jede Woche durch ein neues Stück aus der Werkstatt ersetzt wurde.

Größere Dauerhaftigkeit zeigten unsere Kathoden aus mit Jod behandeltem Kupfer. Diese stellten wir zuerst in der Weise her, daß das blanke Metallrohr in einen oben und unten offenen, senkrechtstehenden Glaszylinder gehängt wurde, unter dessen unterem Ende ein erwärmtes Porzellanschälchen mit metallischem Jod aufgestellt war. Beim Erwärmen des Zylinders mit einer Flamme entstand ein Luftstrom, der die Joddämpfe am Metallrohr vorüber nach oben führte. Auf dem sich ebenfalls erwärmenden Metall bildete sich ein grünlichweißer Belag, der später als Kathodenoberfläche diente. Solchermaßen behandelte Zählrohre gaben mit mitogenetischen Präparaten 14 Tage bis 4 Wochen lang gleichmäßige Effekte, abgesehen davon, daß die Stoßzahl, die anfangs etwa 5 bis 10 pro Minute betrug, allmählich meist bis auf 1 bis 2 pro Minute sank. Dies war häufig der Anlaß, die Rohre außer Betrieb zu nehmen, da für unsere Zwecke die Zählungen dann zu viel Zeit beansprucht hätten.

Bei diesem Verfahren zeigte sich eine auffallende Analogie zu den anfangs besprochenen Alterungserscheinungen. Während die erste Jodbehandlung eine hellgrüne Schicht ergab, wurden nach mehrmaliger Wiederholung des Verfahrens rötlich gefärbte Schichten erhalten. Das gleiche Ergebnis hatten mehrere Versuche mit Rohren, die zuvor längere Zeit mit blanker Oberfläche als Zähler benutzt worden waren. Mit Kathoden dieser Farbe schlugen alle mitogenetischen Versuche (ihre Zahl entspricht ungefähr den Versuchen einer unserer großen Tabellen) ausnahmslos fehl.

Später jodierten wir einige Rohre mit Erfolg in der in Abb. 5 skizzierten Weise. Zwei einseitig mit Jod bedampfte Glasplatten (G) werden so aufeinandergelegt, daß Joddämpfe nur aus dem schmalen Spalt (S) in die Apparatur diffundieren können. Über diesen Schlitz wird in der skizzierten Weise das Zählrohr gelegt und in einer trockenen CO_2-Atmosphäre einige Stunden bei Zimmertemperatur der Einwirkung des Jods überlassen, bis ein kräftiger gleichmäßiger Niederschlag entstanden ist. In gleicher Weise behandelten wir Silberrohre. Sie mußten bei der Herstellung und auch bei den Messungen vor allzu starker Einwirkung von sichtbarem Licht stets geschützt werden, arbeiteten aber im übrigen über einen Monat lang sehr konstant.

Es sei noch erwähnt, daß die Auswahl geeigneter Metallproben für unsere Rohre wichtig war. Wir hatten in München z. B. Rohre aus einer tombakähnlich aussehenden Kupfersorte, bei denen alle Versuche fehlschlugen, für mitogenetische Strahlung empfindliche Zähler herzustellen, während uns eine Elektrolytkupfersorte viele brauchbare Zählrohre lieferte. Hier in Leningrad gelangen mit blanken Kupferrohren mitogenetische Versuche, während die Versuche mit jodierten Kupferrohren versagten und gleichzeitig der Jodbelag eine ganz andere Färbung zeigte.

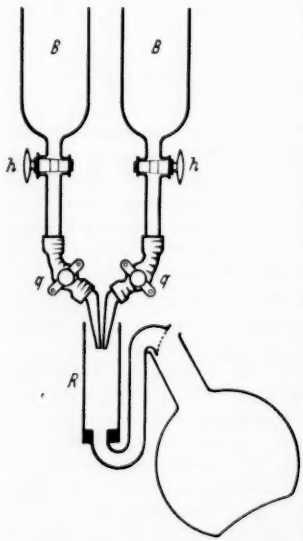


Abb. 6. Anordnung für die Reaktion $FeSO_4 + K_2Cr_2O_7$.

Nach den vorangehend geschilderten Erfahrungen erscheint es uns nicht allzusehr verwunderlich, daß gerade bei den bestgereinigten und entgasten Zählrohren die mitogenetischen Versuche häufig fehlschlugen. Ähnlich wie bei den Photozellen scheint hier die maximale Ausbeute an Photoelektronen unter anderen Bedingungen aufzutreten, die bei den Zählrohren für Ultraviolett jedoch noch nicht geklärt werden konnten.

§ 4. Die Strahlungsquellen.

Zur Ausführung der Versuche mit der *Ferrosulfatreaktion* diente ein Apparat nach Abb. 6. Die Reaktion geht in der Quarzkammer (R) vor sich. Die Büretten (B) enthalten die reagierenden Flüssigkeiten $K_2Cr_2O_7$ auf der einen und $FeSO_4 + H_2SO_4$ auf der anderen Seite in normaler Verdünnung. Der Zustrom zum Reaktionsgefäß wird mit Hilfe der Quetschhähne (q) auf etwa 30 Tropfen pro Minute reguliert. In etwa 1 cm Abstand von der Quarzküvette befindet sich das Zählrohr. Die Kontrollzählungen wurden bei diesen Versuchen stets abwechselnd entweder durch Abstellen der Hähne (h) oder durch Einschieben einer Glasplatte zwischen Zähler und Strahlungsquelle oder endlich durch Beiseitestellen des Reaktionsapparates gemacht, um allenfalls auftretende Störungen durch Dämpfe oder Ladungen feststellen zu können.

Bei den *Eiweißreaktionen* kam zunächst eine elektrisch auf 35° geheizte Kammer nach Abb. 7a zur Verwendung. Später zeigte sich, daß bei den Fibrinversuchen die Heizung weggelassen werden konnte, wenn die Zimmertemperatur etwa 20° betrug. Es wurden deshalb auch Versuche mit prismenförmigen, oben offenen Zelluloidbehältern nach Abb. 7c gemacht, in denen das Reaktionsgemisch mit seiner freien Oberfläche dem Zählerfenster in 5 cm Entfernung gegenüberstand. Kontrollen wurden hier ebenfalls, wie in den Tabellen näher angegeben, in verschiedener Weise ausgeführt. In diese Kammern wurden Gemische von feingemahlenem Blutfibrin mit Pepsin und Salzsäure, sowie mit Trypsin und Na_2CO_3 bzw. mit Trypsin und $NaHCO_3$ gegeben. Eine merkliche Änderung der gemessenen Effekte bei Variation der Konzentrationen oder der Temperatur war bei kürzeren Versuchsreihen nicht feststellbar, dagegen haben wir uns in längeren Versuchen davon überzeugt, daß Fibringemische, die über 1 Stunde alt waren, oder Fibrin ohne Zusatz von Ferment keine Wirkung auf den Zähler ausübten.

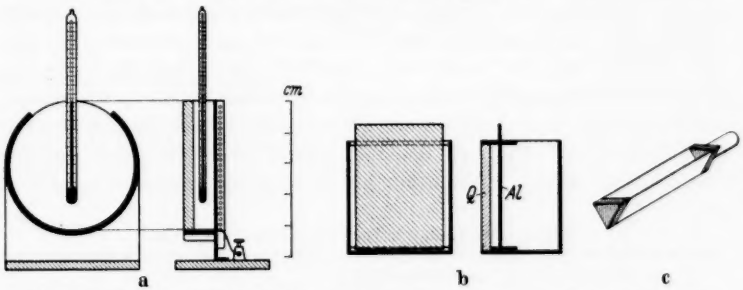


Abb. 7. a und c: Behälter für Eiweißreaktionen. b: Aluminiummodell nach *Braunstein* u. *Pototzky*.

Abb. 7b zeigt das Aluminiummodell nach *Braunstein* und *Pototzky*, wie es bei den Versuchen der Tabelle VII zur Anwendung kam. In der mit normaler Salzsäure gefüllten Kammer steht eine blankgeschabte Al-Platte in 2 bis 3 mm Abstand dem Quarzfenster (Q) gegenüber. Etwa 10 Minuten nach dem Ansetzen beginnt lebhafte Entwicklung kleiner Gasbläschen, und das Gerät wurde dann in Gebrauch genommen. Nach je 20 Minuten wurde die Säure erneuert.

Die bei den Versuchen Nr. 1 und 9 der Tabelle VII benutzten Mäusetumoren wurden in einer gleichen Quarzkammer in einigen mm Abstand vom Fenster in Ringerglucose aufgehängt.

§ 5. Versuchsergebnisse mit primären Strahlungsquellen.

Der Vollständigkeit halber führen wir auch unsere ersten Ergebnisse hier mit an, die schon einmal gelegentlich einer Festschrift veröffentlicht wurden[1].

Unsere ersten Versuche wurden mit der Reaktion $K_2Cr_2O_7 + FeSO_4 + H_2SO_4$ in einem Apparat nach Abb. 6 angestellt. Die Kontrollzählungen wurden in häufig variierter Weise, wie auf S. 322 beschrieben, ausgeführt.

[1] *H. Barth*, l. c.

Sie wechselten in Abständen von einigen Minuten mit Bestrahlungen der gleichen Dauer. Einige Versuche mit Aluminiumzählern der Konstruktion von *Frank* und *Rodionow* (l. c.) ergaben die Resultate Nr. 1 bis 5 der Tabelle I. In Übereinstimmung mit den früher von *Frank* und *Rodionow* erhaltenen Resultaten ergab sich eine beträchtliche Einwirkung auf den Zähler[1].

Eine spätere Wiederholung dieser Versuche mit einem nach Abb. 4 gebauten Zähler, dessen Kathode ausschließlich im kurzwelligen Ultraviolett, d. h. unterhalb 2100 Å beträchtliche Empfindlichkeit besaß, lieferte das Ergebnis 6 der Tabelle I. Der Versuch 7 wurde mit einem Kupferzählrohr gemacht, das bei geringer lichtelektrischer Ausbeute gleichzeitig eine besonders niedrige Dunkelentladungszahl besaß. Dieser zeitraubende Versuch wurde nicht bis zu großen Stoßzahlen fortgesetzt. Das Ergebnis beträgt jedoch immerhin mehr als das Dreifache der statistischen Schwankung, die ungefähr für den Dunkeleffekt zu erwarten wäre. Dies scheint uns interessant im Zusammenhang mit der auch von *Audubert*[2] gemachten Beobachtung, daß es bei Zählrohrversuchen mit mitogenetischen Strahlern oft weniger auf die absolute Quantenausbeute, als auf deren Verhältnis zum Dunkeleffekt ankommt. Auch wir machten häufig die Feststellung, daß der Dunkeleffekt bei den Rohren mit hoher Ausbeute besonders groß war.

Tabelle I. $K_2Cr_2O_7 + FeSO_4 + H_2SO_4$.

Nr.	Kathode	Mit Reaktion			Ohne Reaktion			Unterschied in %
		Zähldauer in Min.	Gesamte Stoßzahl	Stöße pro Min.	Zähldauer in Min.	Gesamte Stoßzahl	Stöße pro Min.	
1	Aluminium	7	124	17,7	16	167	10,4	+ 70
2	„	23	286	12,4	46	380	8,2	+ 50
3	„	11	129	11,7	23	141	6,1	+ 92
4	„	12	121	10,1	17	141	8,3	+ 22
5	„	5	43	8,6	10	62	6,2	+ 29
	Gesamtergebnis	58	703	12,1	112	891	8,0	+ 51
6	Jodsilber	126	412	3,3	126	327	2,6	+ 26
7	Kupfer	86	70	8,1	114	75	0,7	+ 52

Eiweißabbaureaktionen.

Die bei diesen Versuchen verwendeten Eiweißgemische strahlen nach den Angaben der Biologen etwa eine halbe Stunde lang, gerechnet vom Zeitpunkt des Zumischens der Fermente. Wie schon erwähnt, zeigte sich auch bei unseren Versuchen mit dem Zählrohr bald, daß

[1] Irrtümlicherweise wurde mehrfach angenommen, daß *Frank* und *Rodionow* bei diesem Versuch keine Einwirkung erhielten, wenn die Reaktion im Dunkeln verlief. Es beruht dies auf einer Verwechslung mit Versuchen, bei denen ein Monochromator zwischen Strahlungsquelle und Zähler eingeschaltet war. — [2] *R. Audubert*, C. r. **200**, 918, 1935.

keine positiven Effekte erhalten wurden, wenn wir Versuche mit Gemischen anstellten, die über eine Stunde alt waren. Wir haben deshalb für die Versuche der Tabellen II bis V etwa halbstündlich die Präparate erneuert. Zählungen mit Bestrahlung und Kontrollzählungen wechselten von 2 zu 2 Minuten. In die Tabellen sind die Ergebnisse so eingetragen, daß je eine Zeile die Summe der mit ein und demselben Reaktionsgemisch erhaltenen Stoßzahlen und der stets über eine gleiche Zeit erstreckten zugehörigen Kontrollzählungen wiedergibt. Die Zahlen der einzelnen Zeile sind — wenigstens bei den ersten Tabellen II und III — zu klein, um das Einzelergebnis einigermaßen aus dem

Tabelle II. Hühnereiklar + Magensaft.

Anordnung und Art der Kontrollzählung	Stoßzahl mit Bestrahlung	Stoßzahl mit Kontrolle	Unterschied absolut	Unterschied in %
Gemisch bei Bestrahlung im Quarzrohr, bei Kontrolle im Glasrohr	264	224	+ 40	+ 12
Heizkammer nach Abb. 7a, Kontrolle durch Zwischenschaltung von Glas	164	145	+ 19	+ 13
	132	91	+ 41	+ 45
	183	151	+ 32	+ 21
Summe:	743	611	+ 132 ± 37	+ 22

Tabelle III. Fibrin + Pepsin + HCl.

Anordnung und Art der Kontrollzählung	Stoßzahl mit Bestrahlung	Stoßzahl mit Kontrolle	Unterschied absolut	Unterschied in %
Heizkammer nach Abb. 7a. Kontrollen durch Beiseiteschieben der Kammer und durch Versuche nach Tabelle VI.	286	260	+ 26	+ 10
	288	240	+ 49	+ 20
	177	155	+ 22	+ 14
	362	318	+ 44	+ 14
	215	205	+ 10	+ 5
	62	54	+ 8	+ 15
	126	89	+ 37	+ 42
Summe:	1517	1321	+ 196 ± 53	+ 15

Bereich der statistischen Unsicherheit herauszuheben. Erst bei den Tabellen IV und V übersteigt eine größere Anzahl der mit dem gleichen Reaktionsgemisch erhaltenen Ergebnisse den dreifachen Betrag der zu erwartenden Schwankung. Die Versuche wurden ohne Auslassungen in die Tabellen eingetragen, d. h. bei den Versuchen (Tabelle II und III) *alle* Versuche, die mit ein und derselben Anordnung gemacht wurden, bei den Tabellen IV bis VI sämtliche überhaupt mit dem betreffenden Reaktionsgemisch ausgeführten Zählungen. Die Gesamtergebnisse der in den Tabellen zusammengestellten Zählungen liegen bei den Tabellen II und III jedenfalls mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit, bei den Tabellen IV und V jedoch sicher außerhalb der möglichen statistischen Schwankung.

Tabelle IV. Fibrin + Trypsin + Na_2CO_3.

Anordnung und Art der Kontrollzählung	Stoßzahl mit Bestrahlung	Stoßzahl mit Kontrolle	Unterschied absolut	Unterschied in %
Heizkammer nach Abb. 7a	86	52	+ 34	+ 65
	111	63	+ 48	+ 76
	192	144	+ 48	+ 33
	128	97	+ 31	+ 32
	104	74	+ 30	+ 40
	50	23	+ 27	+ 112
Kontrollzählung durch Beiseiteschieben der Strahlungsquelle und durch Versuche nach Tabelle VI.	47	37	+ 10	+ 27
	95	108	+ 13	— 12
	44	16	+ 28	+ 175
	118	94	+ 24	+ 26
	28	20	+ 8	+ 40
	98	101	— 3	— 3
Freie Oberfläche nach Abb. 7c	113	105	+ 8	+ 8
	65	78	— 13	— 17
	85	57	+ 28	+ 49
	82	62	+ 20	+ 32
Summe:	1446	1131	+ 315 ± 51	+ 28

Tabelle V. Fibrin + Trypsin + $NaHCO_3$. Cu-Jod-Zählrohr.

Anordnung und Art der Kontrollzählungen	Stoßzahl mit Bestrahlung	Stoßzahl mit Kontrolle	Unterschied absolut	Unterschied in %
Freie Oberfläche nach Abb. 7c	56	41	+ 15	+ 38
	78	64	+ 14	+ 23
	36	26	+ 10	+ 38
	41	26	+ 15	+ 58
	97	71	+ 26	+ 37
	67	50	+ 17	+ 34
	143	94	+ 49	+ 52
	90	63	+ 27	+ 43
	120	101	+ 19	+ 19
	78	57	+ 21	+ 37
	52	37	+ 15	+ 40
	196	141	+ 55	+ 39
Kontrollzählungen durch Entfernen der Kammer	92	58	+ 34	+ 59
	51	30	+ 21	+ 70
	29	20	+ 9	+ 45
	27	23	+ 4	+ 17
	32	16	+ 16	+ 100
	111	59	+ 52	+ 88
	73	40	+ 33	+ 83
	172	113	+ 59	+ 52
	61	49	+ 12	+ 25
	97	100	— 3	— 3
	138	117	+ 21	+ 18
	149	121	+ 28	+ 23
	97	60	+ 37	+ 62
Summe:	2182	1577	+ 605 ± 61	+ 39

Tabelle VI. Kontrollversuche mit Wasser.

Anordnung	Stoßzahl mit Bestrahlungsanordnung	Stoßzahl mit Kontrollanordnung	Unterschied absolut	Unterschied in %
Mit Heizkammer nach Abb. 7a	154	146	+ 8	+ 5
	156	176	− 11	− 6
	144	160	− 16	− 10
	201	220	− 19	− 9
	58	38	+ 20	+ 53
Freie Oberfläche nach Abb. 7c	63	51	+ 12	+ 24
	60	70	− 10	− 14
	49	56	− 7	− 13
	22	18	+ 4	+ 22
	68	65	+ 3	+ 5
	79	72	+ 7	+ 10
	171	150	+ 21	+ 14
	181	160	+ 21	+ 13
Summe:	1415	1382	+ 33 ± 53	+ 2

Die Reaktionsgemische wurden nach den Angaben von *Gurwitsch* zusammengestellt. Wie die Strahlungsquellen beim Versuch angeordnet waren und welche Kontrollen vorgenommen wurden, ist jeweils in den Tabellen angegeben. Als besonders wichtige und naheliegende Kontrolle wurde zwischen den einzelnen Meßreihen eine Anzahl von Versuchen eingeschaltet, bei denen sich reines Wasser an Stelle der reagierenden Substanzen im Behälter befand; sie wurden im übrigen genau wie die eigentlichen Messungen durchgeführt. Diese Kontrollen sind in Tabelle VI zusammengefaßt. Eine Beeinflussung des Zählrohrs blieb in diesem Falle aus.

Gleichzeitig mit den Versuchen der Tabellen IV bis VI wurde eine große Anzahl von Versuchen mit Blut für die Universitäts-Kinderklinik in München mit den gleichen Zählrohren durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls Behälter nach Abb. 7c benutzt. Für die Kontrollzählungen wurden diese durch gleichgebaute Gefäße mit Wasser ersetzt.

Auch hier ergaben sich bei einer großen Anzahl von Blutproben erheblich größere Stoßzahlen als bei den Kontrollen, nicht aber trat das Umgekehrte ein, wie man es für die Hälfte der Versuche erwarten müßte, wenn es sich dabei um statistische Schwankungen gehandelt hätte.

Da nach dem Zusammenmischen der Reaktionskomponenten die Stoßzahlen meist von 2 zu 2 Minuten aufgeschrieben wurden, versuchten wir Aufschluß über den mittleren zeitlichen Verlauf der Intensität der Einwirkung auf den Zähler zu gewinnen. Zur Erläuterung sei das Protokoll eines Einzelversuchs angegeben:

	F	*L*	*F*	*L*	*F*	*L*	*F*	*L*	*F*	*L*
Stöße in 2 Min.	19	19	17	10	22	10	12	12	12	11

F = Zählung mit Fibringemisch, *L* = Leerlauf.

Durch Untereinanderschreiben sämtlicher Versuche in dieser Weise und Addition der senkrechten Kolonnen ergeben sich für das Material der Tabellen IV bis VI die Diagramme der Abb. 8.

Demnach würde die Strahlungsintensität für die ausgeführte Reaktion Fibrin + Trypsin nach dem Ansetzen des Gemisches zunächst sehr steil ansteigen und nach etwa 25 Minuten auf die Hälfte zurückgehen. Die Kurve für die Kontrollen mit Wasser bewegt sich innerhalb der zu erwartenden statistischen Schwankung des Dunkeleffektes und deutet keinen systematischen Gang mit der Zeit an.

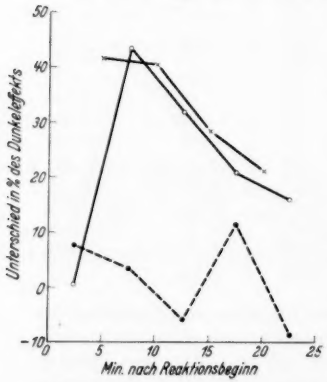


Abb. 8. Zeitlicher Gang der Intensität bei der Fibrinreaktion.
(○—○—○) Versuche der Tabelle IV.
(×—×—×) Versuche der Tabelle V.
(●–●–●) Kontrollversuche mit Wasser (Tabelle VI).

Diese Kurven stützen ebenfalls die Annahme, daß es sich bei den gemessenen Effekten um eine Strahlungswirkung des Präparats auf den Zähler, und nicht um zufällige Schwankungen der Zählungsergebnisse handelt. Auch könnten subjektive Beobachtungsfehler wohl schwerlich zu einem solchen Resultat führen, da ein derartiger zeitlicher Verlauf angesichts der kleinen Stoßzahlen im Einzelversuch gar nicht in Erscheinung tritt. Die Eiweißversuche haben also jedenfalls in den Tabellen IV und V eine statistisch gesicherte Einwirkung des Präparats auf den Zähler ergeben, die sich auch bezüglich des Zeitverlaufs mit den Befunden der Biologen zu decken scheint. Die Einwirkung war unter den verschiedenen Versuchsbedingungen die gleiche; dabei wurden letztere so variiert, daß sich Störungen durch Feuchtigkeit und elektrische Felder dabei hätten in ganz verschiedener Weise auswirken müssen.

Dritter Teil.

§ 6. Versuche mit Sekundärstrahlung.

a) Einleitendes.

Die Frage der Sekundärstrahlung bietet der physikalischen Interpretation die größten Schwierigkeiten. Sie ist der mitogenetischen Schule[1] zu einem derartig wichtigen Bestandteil aller Problemstellungen und Versuche geworden, daß wohl mit ihrer Existenz oder Nichtexistenz das ganze mitogenetische Problem, so wie es heute formuliert ist, stehen oder fallen müßte. Bemerkenswert erscheint es in diesem Zusammenhang, daß die Versuche von *Kreuchen* und *Batemann*, die mit abgeänderten Arbeitsmethoden mitogenetische Induktionseffekte „unter Außerachtlassung der zweifelhaften Theorie einer Sekundärstrahlung" reproduzieren wollten, zu einem Mißerfolg führten.

[1] *A. Gurwitsch*, Die mitogenetische Strahlung; Berlin 1932, S. 279ff.

An nichtlebender Substanz wird über derartige Erscheinungen zum ersten Male in einer Arbeit von *A.* und *L. Gurwitsch*[1] berichtet. Bei der Spaltung von Nucleinsäure durch Carcinomfermente war die Emission von Strahlung beobachtet worden, und zugleich wurde festgestellt, daß die verwendete Nucleinsäure den fraglichen Wellenlängenbereich bereits in dünnen Schichten völlig absorbiert. Auf Grund einer Experimentaluntersuchung kamen die Autoren zu dem Ergebnis, daß die Strahlung von dem Substrat bereits emittiert wurde, bevor das Ferment bis an die ausstrahlende Oberfläche diffundiert sein konnte. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß ähnliche Vorgänge, wie sie als Sekundärstrahlung bei den biologischen Detektoren beobachtet worden waren, sich möglicherweise auch in der Nucleinsäure abspielen. Es wurde vermutet, daß bei der Bestrahlung im Substrat Vorgänge ausgelöst werden, die sich nach Art von Kettenreaktionen in demselben fortpflanzen und ihrerseits mit der Emission von Strahlung verbunden sind. Die früher zum Studium der Fortleitung des Induktionseffektes in der Zwiebelwurzel entwickelte Versuchsmethodik wurde nun in der zitierten Arbeit auf die Nucleinsäure angewandt und ergab hier ebenfalls ein positives Resultat. Die Versuche wurden dann auch auf eine Reihe anderer Substrate ausgedehnt und ergaben bei Eiweiß[2], Glucose[3], Harnstoff[4], sowie einigen Ölen[5] ebenfalls Sekundäreffekte, die mit Hilfe der Hefemethodik spektral untersucht wurden. Zur Erklärung der Induktionseffekte von in flüssigen Medien suspendierten Detektoren wurden diese Ergebnisse zum ersten Male von *Wolff* und *Ras* in ihrem Bericht über Induktionseffekte bei stark verdünnten Staphylococcenkulturen in absorbierender Bouillon herangezogen. Auch *Wolff* und *Ras* haben dann spezielle Sekundärstrahlversuche mit positiven Resultaten[6] ausgeführt.

Die Aussagen von biologischer Seite über die Sekundärstrahlung lauten zusammenfassend etwa folgendermaßen[7]: Die Wirkung einer Bestrahlung mit mitogenetischen Quellen pflanzt sich im Substrat auf größere Strecken mit einer Geschwindigkeit von einigen Metern pro Sekunde fort; es wird vermutet, daß die Zahl der sekundär emittierten Quanten dabei diejenige der primär einfallenden unter Umständen übertreffen kann. Die spektrale Zusammensetzung der sekundären Strahlung ist die gleiche wie sie bei der fermentativen Spaltung der betreffenden Substrate auftritt. Endlich wird angegeben, daß Sekundärstrahlung nur mit solchen primären Strahlungsquellen angeregt werden konnte, deren mitogenetische Spektren Wellenlängen enthielten, die

---

[1] *A.* u. *L. Gurwitsch*, diese Zeitschr. **246**, 127, 1932. — [2] *G. Billig, N. Kannegießer* u. *L. Selowieff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **210**, 1932. — [3] *A.* u. *L. Gurwitsch*, L'Analyse mitogenetique spektrale, Paris 1934. — [4] *E. G. Prokofieja*, Nature **134**, 1934. — [5] *A. D. Braun*, Nature **134**, 536, 1934. — [6] *L. K. Wolff* u. *G. Ras*, Zeitschr. f. Bakt. I. Abt. Orig. **123**, 257, 1931; **128**, 305, 315, 1933. Die Ergebnisse von *Wolff* und *Ras* wurden in letzter Zeit durch eine Untersuchung mathematischen Inhalts (*J. Westenberg*, Dissertation Amsterdam 1935) in Frage gestellt. Da die Arbeit sich auf minimales Zahlenmaterial stützt und zudem nicht ganz frei von Verwechslung elementarer mathematischer Begriffe ist, halten wir sie jedoch nicht für sehr beweisend. — [7] *A. Gurwitsch*, Protoplasma **25**, 2, 1936.

auch im Spektrum der Sekundärstrahlung enthalten sind (Resonanzprinzip nach *Gurwitsch*).

Es ist schwierig, diese Aussagen mit bestimmten physikalischen Vorstellungen in Einklang zu bringen. Man wird berücksichtigen müssen, daß es sich hierbei um sehr komplexe Erscheinungen handeln kann. Wir bringen im nachfolgenden einige Einzelergebnisse unserer physikalischen Versuche über die Sekundärstrahler, die sehr für die physikalische Realität der mitogenetischen Beobachtungen sprechen.

b) Versuche zum Nachweis von Sekundärstrahlung mit dem Zählrohr.

Wenn Sekundärstrahlung überhaupt mit dem Zählrohr registriert werden kann, so war zu erwarten, daß sich mit ihrer Hilfe die Hauptschwierigkeiten umgehen lassen, die bei den physikalischen Versuchen mit primären Strahlungsquellen bestehen. Das Zählgerät kann in das sekundärstrahlende Medium eingebettet werden und so ohne Lichtverlust gegen Beeinflussungen von außen, wie sie sonst beim Wechsel zwischen Präparat und Kontrolle zu befürchten waren, völlig geschützt werden. Wir

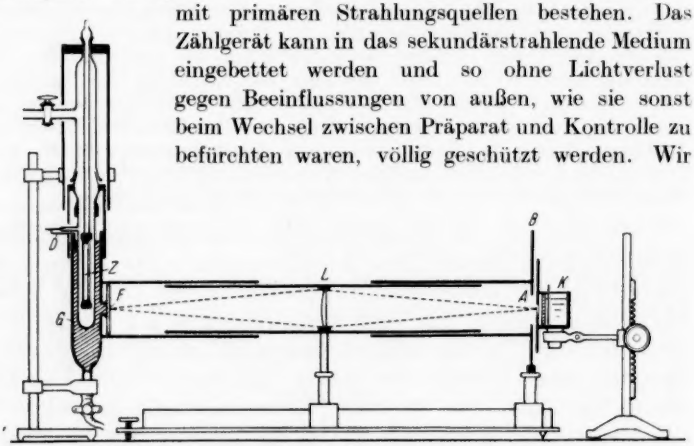


Abb. 9. Anordnung zu den Versuchen mit Sekundärstrahlung. In Papprohre eingebaut zur Vermeidung starker Beleuchtung während der Versuchspausen.

machten daher den Versuch, eines unserer Jodsilberzählrohre in ein Gefäß mit Glucoselösung einzusenken und die Glucose von außen zu bestrahlen.

In Abb. 9 ist die endgültige Anordnung gezeichnet, wie sie bei unseren letzten Versuchen benutzt wurde. Ein Zählrohr (*Z*) steht konzentrisch in einem Glasgefäß (*G*), das mit 75 ccm einer 5%igen Glucoselösung gefüllt ist. Bei *F* kann die Glucose durch ein rundes Quarzfenster von 8 mm Durchmesser bestrahlt werden. Der Zählerspalt beginnt etwas oberhalb *F*, so daß primäre Strahlung nur sehr geschwächt in den Zähler gelangen kann. Durch einen Draht (*D*) wird der Glucosemantel ständig auf dem Potential der Kathode gehalten, um einen völligen Schutz des Zählrohrs gegen elektrostatische Beeinflussungen von außen zu erzielen. — Als primäre Strahlungsquellen

wurden sowohl das Aluminiummodell nach *Braunstein* und *Pototzky*, als auch Mäusecarcinome in Ringerglucose nach *Gurwitsch*[1] benutzt, die sich beide zur Anregung der Sekundärstrahlung der Glucose eignen. Sie waren in der auf Abb. 7b beschriebenen Quarzkammer (K) untergebracht, deren Austrittsfenster (A) durch eine aufgeklebte Blende auf 8 mm Höhe und 30 mm Breite verkleinert war. — Ein Stativ mit Zahntrieb gestattete die Kammer in vertikaler Richtung zu verschieben, oder, wenn die Kammer anderweitig befestigt wurde, eine Glasplatte vor das Fenster zu bewegen. Bei den letzten unserer Versuche wurde, wie auf der Abbildung gezeichnet, das Fenster A auf F mit Hilfe einer Quarzlinse (L) aus einem halben Meter Abstand abgebildet, wozu die Einrichtung auf einer optischen Bank montiert war. Die Brennweiten der Linse wurden für sechs verschiedene Wellenlängen im Bereich zwischen 219 und 390 mμ an einer anderen Aufstellung mit Bogenlampe, Quarzmonochromator und Uranglasschirm bestimmt und die richtige Einstellung der Linse für den im Versuch vermutlich maßgebenden Wellenlängenbereich um 2160 Å an unserer Apparatur mit Hilfe des Maßstabes eingestellt. Die richtige optische Achse ließ sich an der Apparatur mit einer kleinen Funkenstrecke und Uranglas am besten ermitteln. Die richtige Einstellung der Kammer (K) wurde auf der Blende (B) markiert; je 1 cm darüber und darunter befand sich eine Marke, auf die bei den Kontrollzählungen eingestellt werden konnte. In letzterem Falle konzentrierte die Linse also die von A kommende Strahlung nicht auf, sondern neben das Fenster F.

Die Versuche selbst wurden mit drei Anordnungen ausgeführt:

1. Die primären Strahlungsquellen wurden mit möglichst großer Oberfläche dem aus dem Glucosegefäß entfernten Zähler direkt gegenübergestellt und ihre Einwirkung gemessen, um ein Urteil darüber zu gewinnen, wie groß sich eine direkte Einwirkung ihrer Strahlung auf den Zähler bei den Anordnungen mit Glucosegefäß bemerkbar machen kann. Das Al-Modell stand bei diesen Versuchen ohne die Blende (A) dem Zählerfenster in 1 cm Abstand gegenüber. Bei den Kontrollzählungen wurde dicht vor das Quarzfenster der Kammer (K) eine Glasplatte geschoben oder die Kammer ganz vom Zähler entfernt. Das Mäusecarcinom wurde in kleinen Stücken in flachen rechteckigen Schalen von $2{,}3 \times 7$ qcm Fläche in Ringerglucose ausgebreitet und unter den horizontal gestellten Zählerspalt gebracht. Ein Gestell mit Zahnbetrieb gestattete, die Schale mit dem Carcinom gegen eine gleiche mit Wasser gefüllte Schale auszuwechseln. Nach der halben Versuchszeit wurde in die vorher mit Carcinom gefüllte Schale Wasser gebracht und das Carcinom in die zuerst als Kontrolle gebrauchte Schale gegeben.

Die Zählergebnisse zeigen die Versuche 1 bis 4 der Tabelle VII. Da wir nur feststellen wollten, ob keine, im Vergleich zu den weiteren Versuchen größenordnungsmäßig stärkeren Effekte auftreten, konnten wir uns hier mit diesen relativ kleinen Zahlen begnügen.

2. Der Zähler befindet sich im Glucosegefäß und die Kammer (K) unmittelbar dem Fenster (F) gegenüber. Die Leerzählungen wurden nach Einschieben einer Glasplatte zwischen F und A vorgenommen. In dieser Anordnung wurde bisher nur das Al-Modell geprüft. Das Ergebnis zeigt Versuch 5 der Tabelle VII. Obgleich in der für eine direkte Einwirkung einer

[1] *A.* u. *L. Gurwitsch*, Zeitschr. f. Krebsforschung **36**, 319, 1932.

von dem Al-Modell ausgehenden Strahlung viel günstigeren Anordnung der Versuche 3 und 4 kein sicheres positives Resultat erzielt wurde, zeigte diese Strahlungsquelle bei Zwischenschaltung der Glucose eine starke Einwirkung auf den Zähler. Der Versuch wurde fortgesetzt, bis der Effekt das 7,6fache der mittleren Schwankung der Leerstoßzahl bzw. das 4,9fache der für die Differenz zu erwartenden Schwankung betrug. Für die Frage, ob es sich hier tatsächlich um in der Glucose ausgelöste Sekundärprozesse handelt, war nun vor allem von Interesse, festzustellen, ob sich das Ergebnis mit völlig umgebauter Apparatur wiederholen läßt, und ob der Effekt verschwindet, wenn die Glucose durch Wasser ersetzt wird. Eine Wiederholung des Versuchs im gleichen Glucosegefäß mit einem anderen Jodsilberrohr, das auch bei anderen Versuchen kleinere Resultate ergab, lieferte das Ergebnis 6. Der Unterschied beträgt hier nur 25 % des Dunkeleffekts, die Zählungen wurden jedoch länger ausgedehnt, bis auch hier das 5,6fache der Schwankung des Dunkeleffekts bzw. das 3,6fache der Schwankung der Differenz erreicht war. Die Versuche 7 bis 9 sind mit einem kleineren Kupferzählrohr gemacht, das in ein Glasgefäß paßte, an dem ein Quarzfenster in gleicher Höhe mit dem Zählerspalt angebracht war. Bei 7 war der Zähler mit seinem Spalt dem Quarzfenster entgegengesetzt angebracht, bei 8 und 9 dem Fenster zugewendet. Die Serien 7 und 8 ergaben ebenfalls eine Einwirkung, die größer war als das Dreifache der Schwankung. Bei 9 war die Anordnung dieselbe wie bei 8, die Glucosefüllung jedoch durch Wasser ersetzt. Eine Wirkung auf den Zähler blieb — soweit man nach dem Versuch annehmen kann — aus. Aus geometrischen Gründen hätte hier ein besonders starker Effekt dann auftreten müssen, wenn das Ergebnis 7 infolge des Einflusses der primären Strahlung zustande gekommen wäre. Wenn die Ergebnisse des zweiten Teils der Tabelle VII überhaupt als eine Strahlungswirkung auf den Zähler gedeutet werden können, so muß diese Strahlung von der Glucose selbst sekundär emittiert worden sein.

Wir suchten noch zu ermitteln, ob die Vermehrung der Zählstöße nicht durch irgendwelche andere Ursachen hervorgerufen sein konnte. Es lag nahe, die Abbildung der primären Strahlungsquelle mit Hilfe einer Linse aus größerer Entfernung zu versuchen. Damit wird die Möglichkeit für ein direktes Eindringen von Primärstrahlung in das Zählerfenster weiter ein-

Tabelle VII.

Nr.	Strahlungsquelle	Stoßzahl		Unterschied		Anordnung
		Bestrahlt	Kontrolle	absolut	in %	
1	Carcinom	246	184	62 ± 21	+ 34	*Direkte Wirkung auf den Zähler.*
2	Al in HCl	113	107	6 ± 11	+ 6	
3	„ „ „	163	135	18 ± 17	+ 21	
4	„ „ „	76	72	4 ± 12	+ 6	
5	„ „ „	259	162	97 ± 20	+ 60	*Direkte Bestrahlung der Glucose.*
6	„ „ „	661	531	130 ± 35	+ 25	
7	„ „ „	656	527	129 ± 34	+ 25	Rohr in Glucose, Spalt hinten.
8	„ „ „	250	182	68 ± 24	+ 37	„ „ „ „ vorn.
9	„ „ „	211	211	0 ± 23	0	„ „ Wasser, „ „
10	Karzinom	433	322	111 ± 27	+ 35	*Bestrahlung der Glucose mit Linsenanordnung nach Abb. 9.*
11	Al in HCl	590	428	162 ± 32	+ 38	
12	„ „ „	173	130	43 ± 17	+ 33	

geschränkt, außerdem lassen sich alle Handgriffe beim Wechsel von Bestrahlung und Kontrollzählung in solcher Entfernung vom Zähler vornehmen, daß jede unbeabsichtigte Wirkung auf das Zählrohr sicher vermieden werden kann. Dieser Versuch führte zu der vollständigen Anordnung der Abb. 9 und zu den Meßresultaten 10 bis 12 der Tabelle VII, die ein eindeutig positives Ergebnis zeigen. Es genügte eine Verschiebung der Kammer (K) um 10 mm aus der optisch richtigen Lage, um die Stoßzahl um 35 bis 38 % zu verringern und die Wirkung trat sowohl bei dem Aluminiummodell als auch bei Carcinom als primärer Strahlungsquelle auf. Auch der kurze Versuch 11, bei dem die Kammer (K) feststand und zu den Kontrollzählungen eine Glasplatte vor das Austrittsfenster (A) geschoben wurde, ergab ein positives Resultat von etwa gleicher Größe.

Damit scheint uns die Nachweisbarkeit von Sekundäreffekten der Glucose sicherzustehen und die Wirkung der primären Strahlungsquellen auf das Zählgerät dürfte durch die Linsenanordnung in besonders eindeutiger Weise als eine Ultraviolettstrahlung nachgewiesen sein.

Auf Grund dieses Ergebnisses erschien zunächst eine Prüfung der Substratabsorption von Interesse. Über deren Resultat soll im letzten Paragraphen berichtet werden.

Nachtrag: Beispiel eines vollständigen Protokolls der mit ein und demselben Zählrohr ausgeführten mitogenetischen Versuche.

Nach den Ausführungen über die beschränkte Haltbarkeit unserer Zählrohre könnte der Gedanke auftauchen, daß die Statistik unserer Resultate Täuschungen etwa der Art enthalte, daß nur solche Rohre als „empfindlich" angesprochen wurden, die aus Zufallsgründen eine größere Anzahl von positiven Einzelversuchen ergeben haben, während andere Röhren als „unempfindlich" verworfen wurden, die aus statistischen Gründen ein anderes Zählresultat ergeben hatten.

Abgesehen von physikalischen Kriterien sind für eine solche Annahme unsere mit ein und demselben Zählrohr erhaltenen Resultate viel zu zahlreich. Wir geben als Beispiel in der Tabelle VIII noch ein *lückenloses* Protokoll der Versuche mit unserem Jodsilberrohr Nr. 2. Es soll gleichzeitig ein Urteil über die Streuung der Einzelablesungen ermöglichen.

Das Zählrohr war 2 Wochen vor Beginn dieser Versuche hergestellt und zunächst längere Zeit zu physikalischen Messungen seiner Arbeitsweise und Empfindlichkeit benutzt worden. Es war mit Wasserstoff von 15 mm Druck gefüllt und wurde während der mitogentischen Versuche nicht mehr mit der Pumpapparatur in Verbindung gebracht. Die Betriebsspannung betrug für die drei Versuche mit der $FeSO_4$-Reaktion 654, 658 und 664 Volt. Von da an arbeitete das Rohr 14 Tage lang sehr konstant und die Spannung wurde nur noch einmal gelegentlich um 2 Volt erhöht.

Bei fast sämtlichen Einzelergebnissen sind die Zählungen so lange fortgesetzt worden, bis der Effekt das Dreifache der statistischen Schwankung der Leerstoßzahl, also den Wert $3\sqrt{B}$ erreicht. Bei den Gesamtergebnissen

Tabelle VIII. Vollständiges Protokoll der mitogenetischen Versuche mit Zählrohr 2. Stoßzahlen unter „*B*" mit Bestrahlung, unter „*K*" mit Kontrolle.

$K_2Cr_2O_7 + FeSO_4 + H_2SO$ (Versuch 6 der Tabelle I) Stöße in 2 Min.										Carcinom in offenen Schalen (Tabelle VII, Nr. 1) Stöße in 2 Min.				Sekundärstrahlung (Tabelle VII, Nr. 5)			
														Stoßzahlen in 2 Min.		Stoßzahlen in 4 Min.	
B	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*
5	4 *	6	2 *	6	8 *	4	2 *	4	4 *	12	2	4	4	9	4	24	10
5	8 *	3	4	10	5	5	4	4	1	9	9	4	4	6	4	21	16
8	2	8	3 *	9	4 *	8	5 *	21	2	7	2	6	5	16	11	30	15
6	4	4	3	3	5 *	6	2	2	4 *	8	3	4	1	10	12	18	19
8	3 *	9	7 *	6	6	10	10 *	11	9 *	10	8	3	2	13	12	24	10
5	3	7	6	9	5	12	7	1	8	8	3	5	3	19	9		
2	1 *	5	5 *	7	9 *	4	3 *	4	7 *	3	7	5	6	18	9	Vorversuch	
2	2	8	7	8	7	2	5 *	5	7	7	5	3	6	5	7	zu Nr. 10	
10	5 *	3	7 *	11	3 *	6	4	13	5 *	13	8	7	5	4	3	13	8
7	7	6	5	6	5	9	5	8	6	5	6	8	2	10	8	18	15
5	4 *	6	7 *	4	7 *	5	11	5	4 *	6	8	8	5	12	4	10	15
6	10	6	2	10	4					5	1	9	8	12	4	15	19
14	6 *	5	6	6	12 *					4	6	6	4	6	7	10	13
				4	6					7	7	8	6				
				5	3					4	7	10	7				
										5	5	5	1				
										4	0	8	9				
										8	5	10	6				
												8	8				
Summe: $B = 159$, $K = 123$				Summe: $B = 104$ $K = 89$		Summe: $B = 149$, $K = 115$				Summe: $B = 246$, $K = 184$ $U = 62 \pm 21$				Summe: $B = 259$, $K = 162$ $U = 97 \pm 20$			

Vorversuch zu Nr. 10 gestrichen, vgl. Text S. 336

Gesamtergebnis:

Bestrahlung 412
Kontrolle (bei Abstellen der Hähne) 156
„ (bei Einschaltung von Glas (*) 169
Unterschied $B-K = 85 \pm 27$

Kontrolle (bei Abstellen der Hähne) 156
„ (bei Einschaltung von Glas (*) 169
Unterschied $B-K = 85 \pm 27$

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Versuche mit Linsenanordnung nach Abb. 9 (Tabelle VII, Nr. 10 und 11) Stöße in 4 Min.								Al-Modell, primäre Wirkung (Tabelle VII, Nr. 2 und 4) Stöße in 4 Min.				Linsenanordnung nach Abb. 9 (Tabelle VII, Nr. 9) Stöße in 4 Min.			
B	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*	*B*	*K*
10	15	11	13	19	12	16	14	13	16	16	14	13	14	16	8
18	8	15	12	17	13	25	12	9	10	12	8	24	16	17	11
20	16	13	7	12	14	19	11	7	7	9	5	18	13	17	10
23	15	16	15	11	8	16	12	14	11	11	15	17	10	10	10
16	19	17	12	12	11	17	15	7	14	11	13	16	16	11	17
19	10	13	9	13	9	13	12	12	11	9	8	14	8	20	10
17	16	13	14	12	6	17	15	14	9	88	9	16	6	21	14
18	8	15	8	16	8	14	9	15	7			13	10	19	16
11	13	10	8	14	13	14	13	10	12			13	8	18	12
21	20	13	8	11	6	11	18	12	10			12	11	12	7
		11	10	13	5	10	8					25	10	11	13
				8	10	15	14					17	21	13	14
				21	9							8	17	20	5
				13	8							22	15		
				13	8										
				11	9										
				5	10										
				15	10										
Summe:		Summe:		Summe:		Summe:		Summe:		Summe:		Summe: $B = 433$, $K = 322$			
$B = 173$		$B = 147$		$B = 236$		$B = 207$		$B = 113$		$B = 76$		$U = 111 \pm 27$			
$K = 130$		$K = 116$		$K = 159$		$K = 153$		$K = 107$		$K = 72$					
Kontrolle durch Glas								Kontrolle durch Glas		Kontrolle durch Verschieben der Kammer					

Gesamtergebnis:
$B = 590$, $K = 428$, $U = 162 \pm 32$

wird auch die in der Tabelle angegebene größere Fehlergrenze, d. h. $\sqrt{B+K}$ in den meisten Fällen um weit mehr als das Dreifache überschritten. Lediglich der Versuch mit primärer Einwirkung des Al-Modells gibt praktisch ein Nullresultat. Wir glauben jedoch auf Grund späterer Messungen, daß es sich hier tatsächlich um eine auf unsere Zähler besonders schwach wirkende Strahlungsquelle handelt, da nur durch starke Erhöhung der Säurekonzentration mit dem Modell größere Effekte zu erzielen waren. — Als das Rohr am Tag nach dem letzten Versuch wieder in Betrieb genommen werden sollte, wurde es durch eine Glimmentladung unbrauchbar.

Bei der endgültigen Auswertung wurde einzig der Vorversuch zu 10 (letzte Spalte des ersten Teils der Tabelle) gestrichen. Außerdem ist in der Tabelle angedeutet, in welcher Weise die Kontrollen variiert wurden. Aus einer größeren Anzahl solcher Protokolle läßt sich damit das Fehlen von Störungen kontrollieren.

§ 7. Mitogenetische Spektren und optische Absorption.

Da bei den Versuchen des § 6 die Wirkung der primären Strahlungsquelle auch bei der Anordnung mit Strahlengang über die Linse erhalten blieb, würde sich nach den bisherigen Schätzungen der Intensität mitogenetischer Strahlung ergeben, daß schon außerordentlich kleine Lichtmengen zur Anregung von Sekundärstrahlung ausreichen. Das gleiche gilt für die auf S. 329 besprochenen Ergebnisse an Glucose und anderen Stoffen, bei denen Sekundärstrahlung auch dann beobachtet wurde, wenn in den Strahlengang zwischen primärer und sekundärer Quelle ein Spektrograph eingeschaltet wurde. Es ist also zu erwarten, daß die sekundären Prozesse nur von solchen Wellenlängen angeregt werden, die von den betreffenden Substraten in der Schichtdicke von etwa 1 cm beträchtlich absorbiert werden. Im Zusammenhang mit dem erwähnten Resonanzprinzip, wonach die Sekundärstrahlung speziell mit den Wellenlängen ihres eigenen Spektrums angeregt werden soll, war es von besonderem Interesse zu sehen, ob sämtliche angegebenen Sekundärstrahlspektren innerhalb der Absorptionsgebiete der betreffenden Stoffe liegen.

Zur Orientierung über die Absorptionsverhältnisse der Substrate wurden zunächst einige Aufnahmen vom ultravioletten Spektrum einer aus Aluminium- und Kupferelektrode kombinierten Funkenstrecke gemacht. In den Strahlengang wurde ein Absorptionstrog mit planen Quarzfenstern gestellt, in den nacheinander die in der biologischen Literatur als Sekundärstrahler angegebenen Substrate als absorbierendes Medium gefüllt wurden. Die absorbierende Schichtdicke betrug 1 cm, die Belichtungszeit je 10 Minuten. Als Vergleichsspektrum dienten gleichzeitig gemachte Aufnahmen, bei denen der Trog mit destilliertem Wasser gefüllt war. Da zunächst nur die Lage der Gebiete starker Absorption ermittelt werden sollte, genügte diese Anordnung. Auf sorgfältigste Reinigung des Absorptionsgefäßes vor jeder neuen Aufnahme wurde besonders geachtet. — Als absorbierende Substrate verwendeten wir: Glucose (*Merck*) 5 %ig, Harnstoff, Thymonucleinsäure 1 %ig, Monobutyrin, Tributyrin und Triolein gesättigt, ferner 0,1 %iges Serumalbumin in 0,5 %iger Kochsalzlösung. Außerdem liegen Mitteilungen über

Sekundärstrahlung bei Kreatinphosphat und Rizinusöl vor. Ersteres kam wegen der schwierigen Herstellung, letzteres deswegen zunächst nicht in Betracht, weil es bei den biologischen Versuchen in emulgierter Form angewandt wurde, sodaß ein analoger Absorptionsversuch hier wenig aussagen könnte.

Die Aufnahmen ergaben, daß die in der Literatur mitgeteilten mitogenetischen Spektren der sekundärstrahlenden Substanzen (Nr. 1 bis 7 der Abbildung), mit Ausnahme zweier noch zu besprechender Fälle,

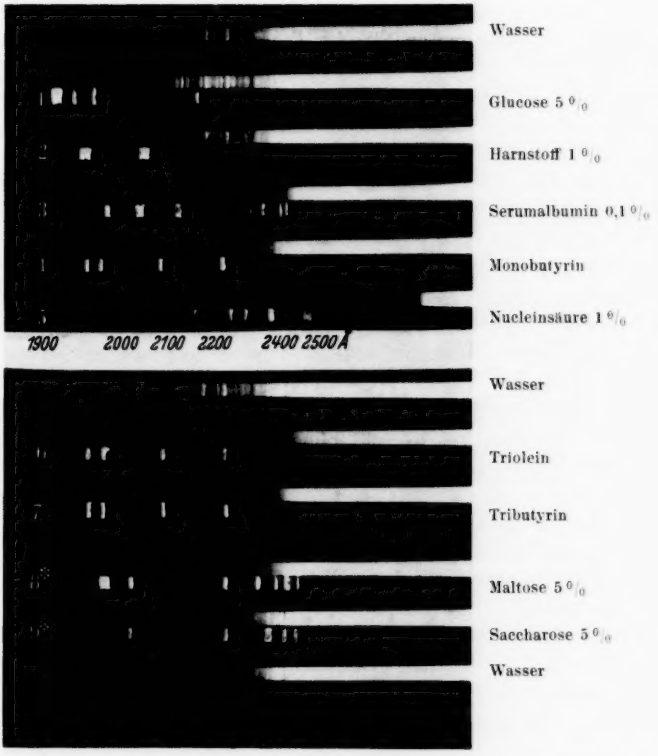


Abb. 10. Absorption des Spektrums einer Funkenstrecke durch 1 cm Schichtdicke der Substrate. Eingezeichnet die mitogenetischen Spektren der Substrate. Nr. 8* und 9* Substrate ohne Sekundärstrahlung.

nicht nur innerhalb der Gebiete starker Absorption liegen, sondern auch eine sehr auffallende Kongruenz mit den Absorptionsspektren bezüglich ihrer Ausdehnung nach der langwelligen Seite hin zeigen. Wir geben in Abb. 10 zwei der Platten wieder.

Neben den Absorptionsspektren sind die zugehörigen mitogenetischen Spektren im Wellenlängenmaßstab der Platte eingezeichnet. Leider konnten die Aufnahmen noch nicht mit einem kontinuierlichen Grundspektrum wiederholt werden; die Stellen des Beginns starker Absorption sind jedoch mit Hilfe der Vergleichsspektren leicht festzustellen. Durch fünfmalige Wiederholung der Aufnahmen überzeugten wir uns, daß keine Fälschungen durch Inkonstanz der Funkenstrecke unterlaufen sind, und durch Variation der Versuchsbedingungen ergab sich, daß die Lage des starken Anstiegs der Absorption bei allen aufgenommenen Spektren charakteristisch wiedergegeben ist.

Der mitogenetische Streifen bei der Glucose 2155 Å sowie die beiden punktiert eingezeichneten Streifen bei Harnstoff liegen in dem — auf dieser Abbildung nicht deutlich erkennbaren — Gebiet schwacher Absorption. Die beiden Streifen des mitogenetischen Harnstoffspektrums wurden auch erst bei einer späteren Wiederholung der Versuche aufgefunden. Vielleicht spielen also Begleitstoffe oder Intensitätsfragen hier eine Rolle. — Bei Nucleinsäure überschreitet das Absorptionsgebiet den mitogenetisch untersuchten Bereich. Da die Hefe im Gebiet um 2600 Å als Detektor zu versagen beginnt, läßt sich nicht entscheiden, ob in diesem Gebiet noch Emissionsstreifen zu suchen wären. Nach *Caspersson*[1] besitzt die Thymonucleinsäure ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 2600 Å. Möglicherweise hängt damit zusammen, daß gerade bei diesem Substrat das mitogenetische Spektrum keine Linien im kurzwelligen Teil aufweist. — Völlig andere Verhältnisse ergaben sich bei Maltose und Saccharose (Nr. 8 und 9), bei denen biologisch keine Sekundärstrahlung feststellbar war. Ihre mitogenetischen Spektren, die in diesem Falle nur bei der fermentativen Spaltung der Stoffe als primäre Emission beobachtet wurden, reichen weit in das Gebiet der guten Durchlässigkeit hinein. Nach den bisherigen Deutungsversuchen für die primäre Emission mitogenetischer Strahlung ist starke Absorption für diese Wellenlängen auch nicht a priori zu erwarten. Da die Wärmetönung der Reaktionen für die Emission so großer Quanten viel zu klein und zudem die Intensität der mitogenetischen Strahlung außerordentlich gering ist, versucht man bekanntlich deren Emission auf vereinzelte, sehr selten auftretende Zustände zurückzuführen[2]. Aus diesen Erwägungen allein ergibt sich demnach keine Notwendigkeit für die Annahme einer größeren Zahl von Molekeln, welche die gleichen Wellenlängen absorbieren können. Unsere Forderung bezüglich der Absorption war ausschließlich aus den eigenartigen Beobachtungen über die Verhältnisse bei der Anregung von Sekundärstrahlung abgeleitet.

[1] *T. Caspersson*, Naturwiss. **23**, 527, 1935. — [2] *G. Frankenberger*, Strahlentherapie **47**, 259, 1933.

Sowohl die Kongruenz zwischen den mitogenetischen Spektren und den Absorptionsgebieten in den zuerst besprochenen Fällen, wie auch deren Ausbleiben in den beiden zuletzt genannten, weist darauf hin, daß möglicherweise zwischen Absorptionsspektren und dem auf S. 329 besprochenen biologischen Verhalten Zusammenhänge bestehen.

Zusammenfassung.

1. Aus den lichtelektrischen Eigenschaften der zu mitogenetischen Versuchen benutzten Zählrohre ergibt sich, daß die als Wirkung mitogenetischer Strahlungsquellen gedeuteten Versuchsergebnisse vermutlich nur dem kurzwelligen Teil der mitogenetischen Strahlung zugeschrieben werden können. Aus diesem Grunde ist es unberechtigt, auf Grund der bisherigen Versuche mit negativen Ergebnissen die Möglichkeit des Nachweises von mitogenetischer Strahlung mit Lichtzählrohren zu bestreiten, da Bestimmungen der Empfindlichkeit der benutzten Geräte für den Wellenlängenbereich von etwa 2200 Å bis 1800 Å noch nicht ausgeführt worden sind. Eine Abschätzung der Empfindlichkeit auf Grund der bei längeren Wellen durchgeführten, fast ausnahmslos sehr unsicheren Bestimmungen ist nicht möglich.

2. Die Beeinflussung der Zählrohre durch Feuchtigkeit und elektrostatische Felder, die für die als mitogenetische Effekte gedeuteten Resultate verantwortlich gemacht wurden, sind an Zählgeräten demonstriert worden, die für solche Einflüsse besonders empfindlich sind. Es wird gezeigt, daß sie zur Erklärung der mit anderen Geräten gewonnenen positiven Resultate nicht ausreichen.

3. Eigene Versuche mit Eiweißreaktionen und einer anorganischen Reaktion haben bei Vermeidung solcher Fehlerquellen statistisch gesicherte Einwirkungen auf Zählrohre ergeben. Die benutzten Zähler und Versuchsanordnungen werden beschrieben.

4. Physikalische Versuche mit der von *Gurwitsch* beobachteten Sekundärstrahlung führten zu positiven Ergebnissen. Mit ihrer Hilfe konnte der Nachweis primärer Strahlung empfindlicher und sicherer gestaltet werden.

5. Die optischen Absorptionsspektren von neun Substraten wurden untersucht und zeigten auffallende Analogien zu den in der mitogenetischen Literatur veröffentlichten mitogenetischen Spektren der betreffenden Stoffe.

Die Bedingungen der biochemischen Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze.

Von

Tadeusz Chrząszcz und **Mikołaj Zakomorny.**

(Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Technologie der Universität in Poznań, Posen.)

(Eingegangen am 11. März 1936.)

Untersuchungen über die Bildung der Citronensäure hatten ergeben[1], daß diese nicht direkt aus Zucker entsteht, sondern aus Umbildungsprodukten des Zuckers nach folgendem Schema:

Zucker → Äthylalkohol (wie bei der Alkoholgärung)
↓
Essigsäure → Äpfelsäure
+ → Citronensäure
Essigsäure

Eine Bestätigung unserer Theorie fanden wir in den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren, besonders in denen von *K. Bernhauer* und Mitarbeitern[2], die in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen die Bildung von Citronensäure durch Aspergillus niger sowohl aus Essigsäure wie auch aus Äthylalkohol feststellten. Eine weitere Bestätigung ist die Feststellung von Bernstein- und Fumarsäure in Kulturen von Mucor stolonifer auf Essigsäure[3], von l-Äpfelsäure in Kulturen von Asp. niger auf Ca-Succinat[4], ferner die Bildung von l-Äpfelsäure aus Fumarsäure durch Asp. niger[5]. Eine Unterstützung unserer Theorie finden wir schließlich auch in den Untersuchungen und Ansichten von *T. K. Walker* und *A. Suther*[6], *N. N. Iwanoff*[7], *S. Kostytschew*[8] und anderen Autoren.

Wir sprachen ferner die Ansicht aus, daß auch bei höheren Pflanzen die Bildung der Citronensäure ähnlich wie bei den Schimmelpilzen vor sich geht. Eine neue Bestätigung dieser Ansicht finden wir in den Untersuchungsergebnissen von *N. N. Iwanoff* und Mitarbeitern[9], die während der Obstreife eine allmähliche Abnahme des Gehalts an Äpfelsäure und eine gleichzeitige Zunahme an Citronensäure beobachteten. In den Früchten weißer Johannisbeeren verschwindet mit zunehmender Reife die Äpfelsäure fast völlig und dafür nimmt der Gehalt an Citronensäure zu; ihre Menge beträgt in völlig reifen Johannisbeeren fast 100% der Gesamtsäure. Daraus geht hervor,

---

[1] *T. Chrząszcz* u. *Tiukow*, diese Zeitschr. **229**, 343, 1930; *T. Chrząszcz*, *D. Tiukow* u. *M. Zakomorny*, ebenda **250**, 254, 1932; *T. Chrząszcz* u. *M. Zakomorny*, ebenda **279**, 64, 1935. — [2] Ebenda **240**, 232, 1931; **253**, 16 u. 30, 1932. — [3] *W. Butkewitsch* u. *Fedoroff*, ebenda **207**, 302, 1929. — [4] *T. K. Walker*, *H. B. Stent* u. *V. Subramaniam*, J. Chem. Soc. 1929, S. 1985. — [5] *F. Challenger* u. *L. Klein*, ebenda 1929, S. 1644. — [6] Biochem. J. **2**, 317, 1932. — [7] Ann. Rev. of Biochem. **1**, 675, 1932. — [8] Pflanzenphysiol. **1**, 338, 1933. — [9] Works on biochem. cultiv. plants **4**, 349 u. 353, 1935.

daß die Äpfelsäure auch in diesem Falle das Material zur Bildung der Citronensäure ist.

Vor kurzem bezweifelten jedoch *Butkewitsch* und Mitarbeiter[1] die Richtigkeit unserer Ansicht und erklärten die von uns angeführten experimentellen Beweise für unzureichend. *Butkewitsch* behauptet nämlich, daß die Citronensäure sich nicht aus Essigsäure bildet, sondern aus Substanzen, die sich in dem fertigen, vorher auf Bierwürze herangezüchteten Mycel bereits vorfinden; er meint, daß bei unseren Untersuchungen sicherlich ein Mycelverlust stattfand, der als Grundlage zur Citronensäurebildung diente. Diese Möglichkeit wäre nur dann ausgeschlossen, „wenn festgestellt würde, daß die Menge der sich während des Versuchs anhäufenden Citronensäure den Gewichtsverlust der Pilzdecke übersteigt".

K. Bernhauer[2] hatte zwar schon einige Ergebnisse angegeben, die von der Unrichtigkeit der Einwände *Butkewitsch*s zeugen, jedoch waren auch diese Befunde ähnlich wie die früheren, mit Schimmelpilzdecken gewonnen, die vorher auf einer Zuckernährlösung gezüchtet waren. Wir hielten es daher für nötig, in dieser Richtung die Entstehung der Citronensäure beim biochemischen Abbau der Essigsäure durch Schimmelpilze erneut zu untersuchen und bedienten uns dabei einer neuen Methode, die es gestattet, das Gewicht und den Einfluß der Entwicklung des Schimmelpilzmycels zu kontrollieren.

Experimenteller Teil und Besprechung der Ergebnisse.

In die zu untersuchende Acetatlösung wurde eine genau abgewogene Menge von Schimmelpilzsporenmasse ausgesät. Diese Masse wurde nach der von uns früher beschriebenen Methode[3] erhalten.

Zunächst war es erforderlich, festzustellen, ob die Schimmelpilzsporen überhaupt in Acetatlösungen zur Entwicklung gelangen und welches dafür die optimalen Bedingungen sind. Aus einer Reihe von Orientierungsversuchen ging hervor, daß auf reiner Na- und Ca-Acetatlösung ausgesäte Schimmelpilzsporen in den meisten Fällen zwar die Fähigkeit zu physiologischer Entwicklung besitzen, daß diese aber sehr langsam und spärlich und bei einigen Schimmelpilzarten sogar überhaupt nicht stattfindet. Ein Zusatz von Mineralsalzen (KH_2PO_4, NH_4NO_3, $MgSO_4$) jedoch wirkt nicht nur auf die Schimmelpilzentwicklung sehr günstig, sondern vermehrt und beschleunigt gleichzeitig den Abbau der Essigsäure. Die Essigsäure kann demnach sowohl als Kohlenstoffquelle wie auch als Energiematerial dienen. Dies ist deshalb wichtig, weil bei den früheren Untersuchungen wegen der Verwendung schon fertigen Mycels diese Einzelheiten nicht genau festgestellt werden konnten.

---

[1] *W. S. Butkewitsch, Menzschinskaja* u. *Trofimowa*, diese Zeitschr. **272**, 290, 1935; **276**, 446, 1935; *W. S. Butkewitsch*, ebenda **272**, 371, 1934. — [2] Ebenda **274**, 110, 1934. — [3] *T. Chrząszcz* u. *M. Zakomorny*, ebenda **279**, 64, 1935.

Tabelle I. Umbildung von Ca-Acetat durch Entwicklung v[illegible] S

Schimmelpilzart	Entwicklungsdauer in Tagen	2 % Ca-Acetat + 0,3 % KH_2PO_4 + 0,1 % NH_4NO_3 + 0,05 % $MgSO_4$						4 % Ca-Ace[illegible] + 0,1 % NH_4[illegible]		
		Mycelgewicht	Myceleunahme	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure	Mycelgewicht	Mycel-zunahme	Ca-A verb
		g	g	g	%	g	g	g	g	g
Aspergillus niger										
Japonicus . .	4—6	0,54	+ 0,04	0,34	3,40	Spuren bzw.		0,72	+ 0,2[illegible]	67
Nr. II. W. . .	4—6	0,71	+ 0,21	0,99	9,90	sehr kleine		0,94	+ 0,4[illegible]	90
Nr. 80 . . .	4—6	0,70	+ 0,20	0,91	9,10	Mengen		0,76	+ 0,[illegible]	81
Japonicus . .	9—12	0,96	+ 0,46	2,06	20,6	—	0,7670	1,26	+ 0,[illegible]	09
Nr. II. W. . .	9—12	1,14	+ 0,64	3,12	31,2	0,2415	0,4759	2,43	+ 1,[illegible]	76
Nr. 80 . . .	9—12	0,89	+ 0,39	1,82	18,2	0,1071	0,4737	1,78	+ 1,[illegible]	28
Japonicus . .	18—20	1,04	+ 0,54	3,19	31,9	Spuren	1,1306	1,74	+ 1,[illegible]	—
Nr. II. W. . .	18—20	1,18	+ 0,68	4,08	40,8	0,2730	1,1071	2,70	+ 2,[illegible]	12
Nr. 80 . . .	18—20	0,97	+ 0,47	3,96	39,6	0,0986	—	2,06	+ 1,[illegible]	73
Japonicus . .	über 30	1,26	+ 0,76	3,41	34,1	—	1,4707	1,93	+ 1,[illegible]	94
Nr. II. W. . .	„ 30	1,20	+ 0,70	4,46	44,6	Spuren	1,1211	3,77	+ 3,[illegible]	—
Nr. 80 . . .	„ 30	1,06	+ 0,56	4,12	41,2	„	1,9694	2,33	+ 1,[illegible]	60

Zur weiteren Untersuchung wurden drei Aspergillusarten verwendet, die sich durch die Fähigkeit, große Citronensäuremengen anzuhäufen, auszeichnen, und zwar Asp. niger W. II., Asp. niger Japonicus und Asp. niger 80. Die Pilze wurden auf Lösungen von 2, 4 und 8 % Ca-Acetat mit Zusatz von 0,3 % KH_2PO_4, 0,1 % NH_4NO_3 und 0,05 % $MgSO_4$ ausgesät (je 0,1 g Sporen) und bei etwa 29° gezüchtet. Zu jedem Versuch wurden fünf *Erlenmeyer*-Kolben von 750 ccm Inhalt verwendet und mit je 100 ccm Nährlösung beschickt. Nach verschieden langer Entwicklungsdauer wurden die Kulturen nach mikroskopischer Prüfung ihrer Reinheit der Analyse unterworfen. Bestimmt wurde der Gehalt an Citronen- und Oxalsäure, die verbliebene Ca-Acetatmenge und das Gewicht des entwickelten Mycels, außerdem wurden die Kulturflüssigkeiten quantitativ auf Aconitsäure untersucht. Die Analyse wurde vollständig analog wie in den früheren Arbeiten durchgeführt.

Wie aus Tabelle I vor allem hervorgeht, konnte in keinem Falle ein Gewichtsverlust an Mycel festgestellt werden. Wir konnten im Gegenteil in allen Fällen ein Wachstum des Mycels und damit eine Zunahme seines Gewichts beobachten, das in manchen Fällen das Gewicht der ausgesäten Sporenmasse mehr als sechsmal übertrifft. Parallel zur physiologischen Mycelentwicklung verläuft die Umbildung bzw. der Verbrauch der Essigsäure, der um so größer ist, je kräftiger sich der Schimmelpilz entwickelt. Daraus folgt, daß die Umbildung der Essigsäure und die Anhäufung ihrer Umbildungsprodukte eng mit der Entwicklung des Organismus verbunden ist und nicht auf Kosten seiner Masse stattfindet.

Die Essigsäure erweist sich also als Nährlösung für den Schimmelpilz. Dabei werden Citronen- und Oxalsäure in verschiedenem Verhältnis zueinander, je nach der Pilzrasse, der Einwirkungszeit des Pilzes

klung v g Sporenmasse verschiedener Asp. niger-Rassen.

4 % Ca-Ace ,1 % NH_4N		,3 % KH_2PO_4 ,05 % $MgSO_4$				8 % Ca-Acetat + 0,3 % KH_2PO_4 + 0,1 % NH_4NO_3 + 0,05 % $MgSO_4$					
el- ht	Mycel-zu-nahme	Ca-Acetat-verbrauch		Citro-nen-säure	Oxal-säure	Mycel-ge-wicht	Mycel-zu-nahme	Ca-Acetat-verbrauch		Citro-nen-säure	Oxal-säure
	g	g	%	g	g	g	g	g	%	g	g
2	+ 0,2	,67	8,35	Spuren bzw. sehr kleine Mengen		Sehr schwache Entwicklung					
4	+ 0,4	,90	14,50								
6	+ 0,2	,81	24,05								
6	+ 0,7	,09	20,45	Spuren	1,4924	0,78	+ 0,28	1,92	4,80	Spuren	0,9804
3	+ 1,9	,76	33,80	0,2818	0,8613	1,62	+ 1,12	4,10	10,25	0,1706	1,0272
8	+ 1,2	,28	21,40	0,1267	1,1736	0,90	+ 0,40	2,81	7,02	Spuren	1,1024
4	+ 1,2	—	—	Spuren	2,6483	0,96	+ 0,46	3,06	7,65	Spuren	1,4709
0	+ 2,7	,12	35,60	0,2614	2,0471	2,07	+ 1,57	5,12	12,80	0,1820	1,4416
6	+ 1,5	,73	23,85	0,1721	2,4780	0,94	+ 0,44	3,17	7,92	Spuren	1,2733
3	+ 1,4	,94	24,70	—	2,8960	0,98	+ 0,48	3,41	7,57	„	1,7819
7	+ 3,2	—	—	Spuren	2,3103	2,27	+ 1,77	6,29	15,62	„	2,4024
3	+ 1,8	,60	28,00	„	—	1,16	+ 0,66	4,02	10,05	„	2,1741

und der Acetatkonzentration angehäuft. Die größte Menge Citronensäure häuft Asp. niger W. II. an, der zu den industriellen, am kräftigsten säurenden Schimmelpilzen gehört. Die schwächste Fähigkeit zeigte in dieser Hinsicht Asp. niger Japonicus. Alle diese Schimmelpilze häufen unter diesen Bedingungen neben Citronensäure sehr viel Oxalsäure an, was um so bemerkenswerter ist, als Asp. niger W. II. und auch Asp. niger Nr. 80 auf *zuckerhaltiger* Nährlösung nur Citronensäure bilden. Die Menge der angehäuften Oxalsäure hängt in hohem Maße von der Einwirkungszeit des Mycels ab. Ein ganz junges, nur wenige Tage altes Mycel bildet nur Spuren oder sehr wenig dieser Säure, dann nimmt diese Menge mit dem Alter allmählich zu, ihre größte Anhäufung findet in gealtertem Mycel statt. Die Menge der Citronensäure dagegen wächst anfangs ebenfalls an, erreicht ein Maximum je nach der Schimmelpilzart nach 10 bis 20 Tagen, nimmt aber dann wieder ab und verschwindet in 30 Tage alten Kulturen fast völlig.

Dies weist darauf hin, daß das allmähliche Verschwinden der Citronensäure auf Grund ihrer Umbildung zu Oxalsäure stattfindet, deren Menge dabei entsprechend zunimmt. Eine junge Kultur bildet unter den von uns geschaffenen Bedingungen mehr Citronensäure als sie weiter umbilden kann, und deshalb erfolgt deren Anhäufung. Später wird die Citronensäurebildung schwächer und hört in alten Kulturen schließlich überhaupt auf; es ist nicht ausgeschlossen, daß in ganz alten Kulturen die Essigsäure sich direkt zu Oxalsäure umbildet.

Analoge Versuche wurden mit anderen Schimmelpilzarten durchgeführt; die Ergebnisse sind in Tabelle II enthalten. Die Sporenmasse wurde auf 4 % Ca-Acetat mit Nährsalzen ausgesät.

Tabelle II. Umbildung von Ca-Acetat durch Entwicklung verschiedener Schimmelpilzsporen.

Schimmelpilzart	Entwicklungsdauer in Tagen	Mycelgewicht g	Mycelzunahme g	Ca-Acetatverbrauch g	Ca-Acetatverbrauch %	Citronensäure g	Oxalsäure g	$CaCO_3$ g	Aconitsäure g
Aspergillus niger W. II.	11	2,43	+ 1,93	6,76	33,80	0,2819	0,8613	0,3902	—
„ oryzea	16	sehr schwache Entwicklung							
Penicillium citreo-nigrum	12	1,52	+ 1,02	4,26	21,30	0,1480	0,4063	0,5164	—
„ Johanioli	12	1,48	+ 0,98	4,40	22,00	Spuren	0,9100	0,2774	—
„ Chrzaszczi	12	0,91	+ 0,41	2,41	12,05	—	0,1796	0,1297	—
Botritis cinerea Nr. 1	14	1,79	+ 1,29	5,08	25,40	0,1680	0,9229	0,4225	—
„ „ „ 2	14	1,40	+ 0,90	4,12	20,60	Spuren	0,9060	0,5120	—
Rhyzopus nigricans	12	1,21	+ 0,71	3,27	16,35	—	1,1436	0,2872	—
Actinomucor rep.	12	sehr schwache Entwicklung							—

Tabelle III. Umbildung von Ca-Acetat bei der Entwicklung von Schimmelpilzsporen unter Zusatz verschiedener Saccharosemengen.

Schimmelpilzart	Entwicklungsdauer in Tagen	Zuckerzusatz %	Mycelgewicht g	Mycelzunahme g	Ca-Acetatverbrauch g	Ca-Acetatverbrauch %	Citronensäure g	Oxalsäure g	Aconitsäure g
Aspergillus niger Japonicus . . .	11	0,5	2,26	+ 1,76	4,26	21,30	0,4876	1,7208	—
„ „ W. II.	12	0,5	2,87	+ 2,37	7,08	35,40	0,2706	0,4810	—
„ „ Nr. 80	11	0,5	2,58	+ 2,08	7,14	35,70	1,3410	1,0312	—
„ „ Japonicus . . .	12	1,0	2,44	+ 1,94	6,32	31,60	0,7044	1,2836	—
„ „ W. II.	14	1,0	3,90	+ 3,40	9,54	47,70	3,3708	0,7612	—
„ „ Nr. 80	11	1,0	3,86	+ 3,36	9,67	48,55	2,4750	0,9733	—
„ „ Japonicus . . .	12	2,0	3,22	+ 2,72	8,71	43,55	1,2632	—	—
„ „ W. II.	11	2,0	5,78	+ 5,28	14,08	70,40	4,0761	0,6571	—
„ „ Nr. 80	14	2,0	5,42	+ 4,92	14,46	72,30	3,6708	1,1237	—

Aus den angeführten Ergebnissen geht hervor, daß die Fähigkeit, Citronensäure aus Essigsäure zu bilden, zwar bei verschiedenen Schimmelpilzarten vorhanden ist, aber stets in individuell verschiedenem Maße. Je kräftiger im allgemeinen die physiologische Entwicklung des Schimmelpilzes ist, um so größer ist auch seine Fähigkeit, Citronensäure und daneben Oxalsäure zu bilden. Diese Regel hat sich uns schon in früheren Arbeiten bei Anwendung *zuckerhaltiger* Nährlösungen ergeben. Daraus würde hervorgehen, daß das Enzymsystem der Citronensäurebildung sich um so leichter und reichlicher bildet, je besser die physiologischen Entwicklungsbedingungen des Pilzes sind. Dieser enzymatische Apparat des Schimmelpilzes ist nicht beständig, sondern wird allmählich mit zunehmendem Mycelalter zerstört, und zwar um so schneller und vollständiger, je ungünstiger die Entwicklungsbedingungen für den Schimmelpilz waren.

Wenn diese Ansicht richtig ist, dann müßte ein Zusatz von Substanzen, welche die Mycelentwicklung günstig beeinflussen, auch einen lebhafteren Essigsäureverbrauch und eine reichlichere Citronensäureanhäufung bewirken. Tabelle III enthält die Ergebnisse von Versuchen mit Zuckerzusatz zu einer 4%igen Ca-Acetatnährlösung. Diese Nährlösung wurde mit Sporen von drei Aspergillusarten besät und nach 11 bis 14 Tagen analysiert.

Aus der Tabelle III geht hervor, daß in jedem Falle bei der Schimmelpilzentwicklung auf Acetatnährlösung zwischen der physiologischen Entwicklung des Schimmelpilzes, dem Verbrauch der Essigsäure und der Anhäufung der Citronen- und Oxalsäure scharf unterschieden werden muß.

Eine gute Nährlösung bewirkt eine schnelle und kräftige Mycelentwicklung. Ca-Acetat allein ist eine kümmerliche und ungenügende Nährlösung, deren Wert durch Zusatz von Mineralsalzen und besonders von Zucker und Mineralsalzen verbessert werden kann. Schon eine verhältnismäßig geringe Zuckermenge bewirkt eine kräftige Schimmelpilzentwicklung, wie aus dem Mycelgewicht zu ersehen ist. Gleichzeitig mit kräftigerer Mycelentwicklung erfolgt ein lebhafterer Verbrauch an Essigsäure und eine größere Anhäufung der Citronensäure bei gleichzeitiger Abnahme der Oxalsäuremenge. Unter den besten Entwicklungsbedingungen ohne Zucker konnte das Mycel auf Acetatnährlösung mit Mineralsalzen nur 7,12 g Ca-Acetat, mithin 35,60% von dessen Gesamtmenge, umbilden, während mit Zuckerzusatz 14,46 g = 72,30% des gesamten Ca-Acetats umgesetzt wurden. Ein Zuckerzusatz von 0,5% zur Acetatnährlösung bewirkte, daß Asp. niger W. II. 2,0706 g Citronensäure gegenüber 0,2819 g ohne Zuckerzusatz bildete. Vollständig umgekehrt verhält sich das Auftreten der Oxalsäure, deren Menge be-

deutend abnimmt, sobald die Entwicklungsbedingungen des Schimmelpilzes sich verbessern. Letztere Erscheinung konnten wir schon wiederholt in früheren Arbeiten bei der Verwendung fertigen, herangezüchteten Mycels feststellen.

Die Frage, ob diese bedeutende Vermehrung der Citronensäure nicht etwa von der Verarbeitung des zugesetzten Zuckers stammt, muß aus zwei Gründen entschieden verneint werden. Der Zuckerzusatz bewirkte eine kräftige Mycelentwicklung, die gerade auf Kosten des Zuckers als eines für diesen Zweck vorteilhaften Materials erfolgte. Dazu kommt, daß der Zusatz von beispielsweise 0,5 g Zucker höchstens eine Vermehrung von etwa 0,4 g Citronensäure zur Folge haben könnte. In Wirklichkeit beträgt sie aber etwa 1,8 g. Daraus geht hervor, daß das Material, aus dem die vermehrte Citronensäureanhäufung erfolgte, bei der kräftigeren Mycelentwicklung nur die Essigsäure sein konnte. Weder in diesem noch in irgendeinem anderen Falle konnten wir bei der Anhäufung von Citronensäure eine Gewichtsabnahme des Mycels feststellen.

Wir glauben, daß wir durch diese Untersuchungen und Beobachtungen gleichzeitig nachweisen konnten, daß die Ansichten von *W. S. Butkewitsch* und Mitarbeitern unrichtig sind.

Bei allen unseren Untersuchungen suchten wir auch die Aconitsäure, die nach *K. Bernhauer*[1] das Zwischenprodukt der Umbildung von Zucker in Citronensäure sein soll. In keinem Falle konnten wir selbst Spuren von Aconitsäure feststellen. Deshalb glauben wir, daß es keine berechtigten Grundlagen für die Ansicht gibt, daß die Aconitsäure ein Zwischenprodukt bei der Bildung der Citronensäure ist.

Zusammenfassung.

1. Die Essigsäure kann in der Form von Ca-Acetat verschiedenen Schimmelpilzen sowohl als Nährlösung zur Entwicklung wie auch als Energiematerial dienen, wobei sie hauptsächlich zu Citronensäure bzw. zu Citronen- und Oxalsäure umgebildet wird.

2. Ein Zusatz von geringen Zuckermengen hat auf die Umbildung der Essigsäure und die Anhäufung der Citronensäure einen vorteilhaften Einfluß.

3. Wegen ungünstiger Zusammensetzung der Nährlösung schwach entwickelte Schimmelpilze sowie altes Pilzmycel bewirken eine nur schwache Umbildung der Essig- in Citronensäure; es kann dann je-

[1] *K. Bernhauer* u. *N. Böckl*, diese Zeitschr. **253**, 25, 1932.

doch eine reichliche und mitunter sogar ausschließliche Anhäufung von Oxalsäure festgestellt werden.

4. Die Ansicht von *W. S. Butkewitsch* und Mitarbeitern, daß die Citronensäure nicht aus Essigsäure, sondern aus Mycelsubstanzen entsteht, ist unrichtig, da bei der Bildung der Citronensäure in jedem einzelnen Falle weder eine Abnahme des Mycelgewichts festgestellt, noch irgendein anderer Beweis gefunden wurde, der die Ansicht *Butkewitschs* bestätigen könnte.

5. In keinem einzigen Falle konnten bei der Bildung von Citronensäure sowohl in Acetat- als auch in Zuckernährlösungen selbst Spuren von Aconitsäure festgestellt werden, was gegen die Hypothese *B. Bernhauers* spricht, der in dieser Säure ein Zwischenprodukt für die Bildung von Citronensäure sehen will.

Über die Bedeutung der Äpfelsäure bei der Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze.

Von

Tadeusz Chrząszcz und **Mikołaj Zakomorny.**

(Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Technologie der Universität in Poznań, Posen.)

(Eingegangen am 11. März 1936.)

In unserer vorhergehenden Arbeit[1] wiesen wir nach, daß bei der Entwicklung von Schimmelpilzen auf Ca-Acetatlösungen Citronensäure aus Essigsäure gebildet wird. Aus den Untersuchungen ging hervor, daß die Schnelligkeit, mit der Essig- in Citronensäure umgebildet wird, von verschiedenen Bedingungen und vor allem von Substanzen abhängig ist, die sich in der Acetatnährlösung befinden und die physiologische Entwicklung des Schimmelpilzmycels beeinflussen. Es zeigte sich, daß Zuckerzusatz zur Nährlösung von besonders vorteilhaftem Einfluß auf die Bildung und Anhäufung der Citronensäure ist. In vorliegender Arbeit soll nun die Frage untersucht werden, ob die verschiedenen Produkte der biochemischen Zuckerumbildung sich analog verhalten. Für das wichtigste dieser Zwischenprodukte halten wir die l-Äpfelsäure, die nach unserer Theorie[2] bei der Bildung der Citronensäure aus Essigsäure einen unmittelbaren Anteil hat. Die Aufgabe vorliegender Untersuchungen war es, demgemäß festzustellen, wie sich bei obigem Prozeß freie l-Äpfelsäure und deren Salze verhalten.

Experimenteller Teil.

Zusammensetzung der Nährlösung und Methodik waren wie in der vorausgehenden Arbeit, nur wurden den Nährlösungen verschiedene Mengen freier l-Äpfelsäure (*Merck*) (0,05, 0,1 und 0,5%) zugesetzt.

Aus Tabelle I geht hervor, daß der Einfluß freier l-Äpfelsäure auf Schimmelpilze von der Konzentration der Äpfelsäure abhängig ist. Ein Zusatz von 0,05% Äpfelsäure zur Acetatnährlösung bewirkt bei allen Schimmelpilzen eine kräftigere Mycelentwicklung und bei gewissen Arten, besonders bei Botrytis cinerea, eine bedeutend größere Anhäufung der Citronensäure. Ein Zusatz von 0,1%iger l-Äpfelsäure hat schon eine schwächere Mycelentwicklung zur Folge mit Ausnahme der Botrytis cinerea-Stämme, bei denen auch weiterhin eine vermehrte Mycelentwicklung und Citronensäureanhäufung zu erkennen ist. Zusatz von 0,5% freier Äpfelsäure hemmt schließlich jede

[1] *T. Chrząszcz* u. *M. Zakomorny*, diese Zeitschr. **285**, 340, 1936. — [2] *T. Chrząszcz* u. *D. Tiukow*, ebenda **229**, 343, 1930.

Mycelentwicklung und Acetatverarbeitung fast bei allen Schimmelpilzen, wobei wiederum eine Ausnahme nur die beiden Botrytis cinerea-Stämme bilden. Diese lassen auch weiterhin nicht nur eine ziemlich kräftige Entwicklung erkennen, sondern ihre Fähigkeit, Citronensäure anzuhäufen, ist sogar größer als in der Acetatnährlösung ohne Äpfelsäure. Daraus kann man schließen, daß diese letztere Säure für diese Pilze überhaupt vorteilhaft ist. Die Anhäufung der Oxalsäure ist dagegen bei Gegenwart freier l-Äpfelsäure bedeutend geringer als ohne Zusatz.

Der günstige Einfluß, den der Zusatz geringer Mengen freier l-Äpfelsäure zur Acetatnährlösung bei einigen Schimmelpilzarten hat, ließ die Frage entstehen, ob ein Zusatz von Essigsäure in gleicher Weise wirkt. Zugabe von 0,05, 0,1 und 0,5 % freier Essigsäure ergab aber bei allen verwendeten Schimmelpilzarten einen durchweg ungünstigen Einfluß, sowohl in bezug auf die Entwicklung des Pilzes, als auch auf den Acetatverbrauch. Das Zahlenmaterial braucht daher hier nicht angeführt zu werden.

Weiterhin wurde der Einfluß von Na-Malat untersucht (Zusatz von mit Natronlauge genau neutralisierter Äpfelsäure).

Aus den in Tabelle II angeführten Zahlen ergibt sich, daß ein Zusatz von Na-Malat fast bei allen Schimmelpilzen auf die physiologische Entwicklung und bei den meisten auch auf den Verbrauch der Essigsäure und die Bildung der Citronensäure einen umso günstigeren Einfluß hat, je größer der Na-Malatzusatz ist; eine Zugabe von 0,5 % zur 4 %igen Ca-Acetatlösung mit Nährsalzen wirkt fast ebenso vorteilhaft, wie ein 0,5 %iger Zuckerzusatz. Bei einigen Schimmelpilzarten war die Wirkung sogar besser.

Der Einfluß des Malats ist nicht nur für das Wachstum der Schimmelpilze günstig, sondern bei einer Reihe von Schimmelpilzen läßt sich dadurch auch eine noch weit kräftigere Anhäufung der Citronensäure erkennen. Bei Asp. niger W. II. z. B. beträgt die Mycelzunahme bei Zusatz von 0,1 % Äpfelsäure (als Na-Malat) 2,04 g und bei Zusatz von 0,5 % (als Na-Malat) 2,44 g, demnach um 19,6 % mehr. Die gleichzeitige Anhäufung der Citronensäure betrug unter diesen Bedingungen 0,4405 und 1,7118 g; der Unterschied beträgt demnach fast 300 %. Bei Botrytis cinerea Nr. 1 betrug das Gewicht des Mycelzuwachses unter den obigen Bedingungen 1,87 und 2,50 g, der Unterschied demnach 33,6 %. Die gleichzeitige Anhäufung der Citronensäure betrug dagegen unter denselben Bedingungen 0,4112 und 1,3618 g, der Unterschied demnach 230 %. Diese Zahlen sind gleichzeitig ein Beweis, daß die Äpfelsäure besonders bei der Bildung und Anhäufung der Citronensäure aus Essigsäure einen lebhaften Anteil hat.

Ein Vergleich des Verhaltens der Schimmelpilze in Acetatnährlösungen, mit und ohne Zusatz von 0,5 % Äpfelsäure (als Na-Malat), ist in Tabelle III zusammengestellt.

Demnach wird durch den Zusatz von Na-Malat das Mycelgewicht um etwa 26 bis 120 % und die Citronensäure etwa 240 bis 700 % vermehrt; dabei ist in Fällen, wo vorher Citronensäure nur in Spuren angehäuft wurde, die prozentuelle Zunahme noch größer. Der Einfluß des Malats ist demnach auf die Citronensäureanhäufung sieben- bis zehnmal größer als auf die

Tabelle I. Einfluß freier l-Äpfelsäure auf die Entwicklung von Schim... Verlauf ...

Schimmelpilzart	+ 0,05 % l-Äpfelsäure									+ 0,1 %
	Mycelgewicht	Mycelzunahme	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure	Mycelgewicht	Mycelzunahme	Ca-Acetatverbrauch	
	g	g	g	%	g	g	g	g	g	
Asp. niger Japonicus	1,70	+ 1,20	5,11	25,55	0,1417	0,4071	1,14	+ 0,6		3,49
„ „ W. II. . .	2,14	+ 1,64	5,72	28,60	0,3126	0,5630	1,22	+ 0,7		3,61
Penic. Johannioli . .	1,21	+ 0,71	3,40	17,00	—	0,7620				
„ citreo-nigrum .	2,13	+ 1,63	6,04	30,20	Spuren	0,7102	1,19	+ 0,6		2,96
Botrytis cinerea Nr. I	2,19	+ 1,69	6,31	31,55	0,2946	—	2,20	+ 1,7		6,71
„ „ „ II	1,90	+ 1,40	5,72	28,60	0,1891	0,4956	2,04	+ 1,5		5,94
Rhizopus nigric. . . .	0,81	+ 0,31	sehr schwache Entwicklung							
Actinomucor rep. . .	0,74	+ 0,24	„	„	„					

Tabelle II. Der Einfluß von Na-Malat auf die Umbildung von ... von Schim...

Schimmelpilzart	+ 0,05 % l-Äpfelsäure als Na-Salz									+ 0,...
	Mycelgewicht	Mycelzunahme	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure	Mycelgewicht	Mycelzunahme	Ca-Acetatverbrauch	
	g	g	g	%	g	g	g	g	g	
Asp. niger Japonicus	2,12	+ 1,62	5,60	28,00	0,2971	0,6800	2,10	+ 1,6		5,42
„ „ W. II. . .	1,89	+ 1,39	5,17	25,85	0,2104	0,3776	2,54	+ 2,1		5,47
Penic. Johannioli . .	1,36	+ 0,86	3,46	17,30	Spuren	0,5719	1,74	+ 1,2		4,17
„ citreo-nigrum .	1,84	+ 1,34	5,91	29,55	0,1288	0,5413	1,99	+ 1,4		5,80
Botrytis cinerea Nr. I	2,27	+ 1,77	5,98	29,90	0,3214	—	2,37	+ 1,8		6,19
„ „ „ II	1,97	+ 1,47	5,62	28,10	0,2197	0,4460	2,14	+ 1,6		—
Rhizopus nigric. . . .	1,29	+ 0,79	3,17	15,85	—	0,5631	1,36	+ 0,8		3,51
Actinomucor rep. . .	0,98	+ 0,48	2,40	12,00	0,0	0,4120	1,12	+ 0,6		3,38

Mycelentwicklung. Die gebildete Oxalsäuremenge ist im allgemeinen um fast 60 % geringer, lediglich bei einigen Schimmelpilzen erfolgt eine geringe Vermehrung. Im allgemeinen ist die Oxalsäurebildung um so geringer, je mehr Citronensäure angehäuft wird.

Schließlich untersuchten wir noch den Einfluß von gleichzeitigem Zusatz von Malat und Zucker zur Acetatmineralsalznährlösung.

Aus den Zahlen der Tabelle IV geht hervor, daß ein Zusatz von 0,5 % Zucker und 0,5 % Äpfelsäure (als Na-Malat) zur Acetatnährlösung fast ausschließlich eine vermehrte Umbildung des Ca-Acetats bewirkt. Diese beträgt bis zu 42,25 % des gesamten Ca-Acetats (Asp. niger W. II.). Es werden 4,1232 g Citronensäure gebildet, was etwa 49 % des verarbeiteten Ca-Acetats entspricht; das prozentuelle Verhältnis ist demnach fast dasselbe, wie bei der Umbildung von Zucker in Citronensäure durch Schimmelpilze in Zuckernährlösungen. Bei anderen Schimmelpilzen sind die entsprechenden Zahlen zwar kleiner, dabei kann man aber auch hier eine ähnlich große Vermehrung der angehäuften Citronensäure

...ilzen und die Umbildung von 4%igem Ca-Acetat mit Nährsalzen im ...erlauf von ... Tagen.

	+ 0,1 % l-Äpfelsäure				+ 0,5 % l-Äpfelsäure					
	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure	Mycelgewicht	Myceizunahme	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure
	g	%	g	g	g	g	g	%	g	g
	3,49	17,45	0,1481	0,3980			sehr schwache Entwicklung			
	3,61	18,05	0,2918	0,6022			„ „ „			
	schwache Entwicklung						keine Entwicklung			
	2,96	14,80	Spuren	—			„ „			
	6,71	33,55	0,2470	0,3049	1,76	+ 1,26	4,71	23,55	0,1821	Spuren
	5,94	29,70	0,2018	0,4051	1,28	− 0,78	3,39	16,95	0,1442	„
	keine Entwicklung						keine Entwicklung			
	keine Entwicklung						„	„		

...g von ...cetat und die Anhäufung von Citronensäure bei der Entwicklung ...Schimmelzsporen.

	+ 0,1 % l-Äpfelsäure als Na-Salz				+ 0,5 % l-Äpfelsäure als Na-Salz					
	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure	Mycelgewicht	Myceizunahme	Ca-Acetatverbrauch		Citronensäure	Oxalsäure
	g	%	g	g	g	g	g	%	g	g
	5,42	27,10	0,3617	0,5479	2,34	+ 1,84	6,41	32,05	0,6219	0,4210
	5,47	27,35	0,4405	0,4160	2,94	+ 2,44	7,41	37,05	1,7118	0,3418
	4,17	20,85	—	0,7714	2,14	+ 1,64	5,62	28,10	0,2814	0,8612
	5,80	29,00	0,3126	0,4819	2,62	+ 2,12	7,19	35,95	0,4986	0,4421
	6,19	30,95	0,4112	0,5014	3,00	+ 2,50	7,60	38,00	1,3618	0,2907
	—	—	0,4706	0,4217	2,47	+ 1,97	6,88	34,40	0,9781	0,3619
	3,51	17,56	0,0	0,7908	1,64	+ 1,14	4,96	24,80	0,0	1,2883
	3,38	16,90	0,0	1,0320	1,36	+ 0,86	—	—	—	—

feststellen, während allgemein die Anhäufung der Oxalsäure geringer wird. Nur in zwei Fällen tritt eine bedeutende Vermehrung der Oxalsäure auf, und zwar bei Rhizopus nigricans und Actinomucor repens; diese Schimmelpilze bewirken auf Acetat- und auch Zuckernährlösung überhaupt keine Anhäufung von Citronensäure. Dieser Umstand weist auf deren spezielle Einstellung und individuell von anderen Schimmelpilzen abweichendes Verhalten hin. Man kann derartige Unterschiede auch bei verschiedenen, auf Zucker gezüchteten Schimmelpilzen feststellen.

Im Hinblick auf die Bildung der Citronensäure erweist sich der Zusatz von Malat + Zucker als wirksamer als der Zusatz von Zucker allein. Denn selbst ein Zusatz von 2 % Zucker war nicht imstande, eine gleiche Citronensäureanhäufung zu bewirken, wie Zusatz von 0,5 % Zucker + 0,5 % Äpfelsäure (als Na-Malat). Daraus schließen wir, daß Malat mit der Bildung und Anhäufung der Citronensäure in direktem Zusammenhang steht.

Tabelle III.

Schimmelpilzart	Mycelzunahme		Unterschied der Zunahme nach Zusatz von Na-Malat		Angehäufte Citronensäure		Unterschied der Citronensäure-anhäufung		Angehäufte Oxalsäure		Unterschied der Oxalsäure-anhäufung	
	ohne Malat g	mit 0,5 % Malat g	g	%	ohne Malat g	mit 0,5 % Malat g	g	%	ohne Malat g	mit 0,5 % Malat g	g	%
Asp. niger Japonicus	—	1,84	—	—	—	0,6219	—	—	—	0,4219	—	—
„ „ W. II. . .	1,93	2,44	0,51	26,4	0,2819	1,7118	1,4299	507,2	0,8613	0,3418	0,5195	— 60,3
Penic. Johannioli . .	0,98	1,64	0,66	67,3	Spuren	0,2814	0,2814		0,9100	0,8612	0,0488	— 5,3
„ citreo-nigrum	1,02	2,02	1,00	98,0	0,1480	0,4986	0,3506	236,9	0,4063	0,4421	0,0358	+ 8,8
Botrytis cinerea Nr. I	1,29	2,50	1,26	93,8	0,1680	1,3618	1,1938	710,6	0,9229	0,2907	0,6322	— 68,5
„ „ „ II	0,90	1,97	1,07	118,8	Spuren	0,9781	0,9781	sehr groß	0,9060	0,3619	0,5441	— 60,0
Rhizopus nigric. . .	0,71	1,14	0,43	60,6					1,1436	1,2883	0,1447	+ 12,7
Actinomucor rep. . .	sehr schwach	0,86	0,86	—	0,0	0,0	0,0	0,0	Spuren	Spuren	0,0	0,0

Tabelle IV. Einfluß von Na-Malat + Zucker auf die Umbildung von Ca-Acetat und die Anhäufung von Citronensäure bei der Entwicklung von Schimmelpilzsporen.

Schimmelpilzart	Entwicklung in Tagen	Mycelgewicht g	Mycelzunahme g	Ca-Acetatverbrauch		Anhäufung von Citronensäure		Anhäufung von Oxalsäure	
				g	%	g	%	g	%
Asp. niger Japonicus . . .	10	2,37	+ 1,87	6,90	34,50	1,4664	21,30	0,2641	3,82
„ „ W. II.	11	2,84	+ 2,34	8,41	42,25	4,1232	49,00	Spuren	—
Penic. Johannioli	9	2,14	+ 1,64	6,07	30,30	Spuren			
„ citreo-nigrum	11	2,10	+ 1,60	6,64	33,20	1,1790	17,70	0,2690	4,05
Botrytis cinerea Nr. I . . .	10	2,91	+ 2,41	8,32	41,60	2,7904	33,50	0,4014	4,82
„ „ „ II . . .	11	2,46	+ 1,96	6,80	34,00	2,0860	30,07	—	—
Rhizopus nigric.	11	1,74	+ 1,24	5,47	27,35	0,0	0,0	2,6424	48,31
Actinomucor rep.	10	1,42	+ 0,92	4,72	23,60	0,0	0,0	2,4106	51,08

Für diese Ansicht spricht auch die Verminderung der gebildeten Oxalsäuremenge bei Malatzusatz. Bei einem Zusatz von 2% Zucker wird noch viel Oxalsäure angehäuft, z. B. bei Asp. niger W. H. 0,6571 g. Bei einem Zusatz von 0,5% Zucker und 0,5% Äpfelsäure (als Na-Malat) dagegen ist die Menge der Oxalsäure nur noch sehr gering, z. B. bei Asp. niger W. H. beträgt sie nur noch Spuren. Nur in einer Richtung hat der Zusatz von 2% Zucker eine bessere Wirkung, und zwar auf das Mycelwachstum, das bei Asp. niger W. H. und bei Asp. niger Japonicus fast zweimal so stark ist, wie auf der Nährlösung mit Zucker- und Malatzusatz. Daraus geht wiederum hervor, daß Malat vor allem an der Bildung der Citronensäure direkt beteiligt ist.

Besprechung der Ergebnisse.

Nach unserer im Jahre 1930 aufgestellten Hypothese der Citronensäurebildung aus Zucker[1] geht dieser Prozeß über den Äthylalkohol bzw. die Essigsäure wie bei der alkoholischen Gärung vor sich. Dabei bildet sich aus Essigsäure über Zwischenprodukte Äpfelsäure, die mit Essigsäure Citronensäure ergibt. Eine Unterstützung dieser Hypothese fanden wir in unseren Untersuchungen über Äthylalkohol[2], aus dem wir ebenfalls Citronensäure erhielten.

Eine schwache Seite unserer Theorie war der Umstand, daß aus Acetaten wie auch aus Äthylalkohol verhältnismäßig nur wenig Citronensäure erhalten wurde. Auch *K. Bernhauer*[3] erhielt aus Essigsäure und Äthylalkohol zwar mehr Citronensäure als wir, aber auch diese Mengen waren verhältnismäßig gering. Dies war auch für *W. S. Butkewitsch* und Mitarbeiter[4] der Grund, sich über die Entstehung der Citronensäure aus Essigsäure kritisch zu äußern. In der vorhergehenden Arbeit konnten wir nachweisen, daß die Vermutung der erwähnten Autoren, die Citronensäure bilde sich aus Mycelsubstanz, nicht richtig war. In den vorliegenden Untersuchungen weisen wir auf diejenigen Bedingungen hin, die auf eine schnellere oder langsamere Bildung und Anhäufung der Citronen- aus Essigsäure einen Einfluß haben. Bei dieser Umbildung der Essigsäure spielt die Äpfelsäure eine sehr wichtige Rolle.

Im Schrifttum finden wir sehr viele Angaben über den Anteil der l-Äpfelsäure an dem Metabolismus organischer Säuren. Vor allem sind hier die Arbeiten von *N. N. Iwanow* und Mitarbeitern zu erwähnen[5]. Unlängst zeigten auch *O. Fürth* und *E. Majer*[6], daß Äpfel- und Essigsäure als Kohlenstoffquelle für den Aufbau der Leibsubstanz von Schimmelpilzen in gleichem Maße Bedeutung haben. *K. Bernhauer* (l. c.) gibt an, daß von ihm untersuchte Asp. niger-Stämme in Zuckerkulturen neben Citronensäure auch Äpfelsäure

[1] *T. Chrząszcz* u. *D. Tiukow*, diese Zeitschr. **229**, 343, 1930. — [2] *Dieselben*, Res. C. r. III. Congr. Botan. a Varsovie St. 45, 1931; *T. Chrząszcz, D. Tiukow* u. *M. Zakomorny*, diese Zeitschr. **250**, 254, 1932. — [3] *K. Bernhauer* u. *H. Siebenäuger*, ebenda **240**, 232, 1931; *K. Bernhauer, N. Böckl* u. *H. Siebenäuger*, ebenda **253**, 37, 1932. — [4] *W. S. Butkewitsch, Menschinskaja* u. *Trofimowa*, ebenda **272**, 290, 1935; **276**, 446, 1935. — [5] Works on biochem. cult. plants **4**, 349, 1935. — [6] Diese Zeitschr. **263**, 332, 1933.

bildeten. Weiterhin stellten *K. Bernhauer* und *Siebenäuger* (l. c.) die Bildung von Citronensäure aus Na-Malat fest. Die spezielle Rolle der Äpfelsäure hebt schließlich *K. Jacobsen*[1] hervor. Wir selbst konnten bei unseren Untersuchungen über die biochemische Umbildung der Essigsäure, des Äthylalkohols und der Fumarsäure[2] dauernd die Anwesenheit und Mitwirkung der Äpfelsäure feststellen. Die gegenwärtigen Untersuchungen heben deren Bedeutung für die Umbildung der Essig- in Citronensäure hervor.

Die Bedeutung der Äpfelsäure auf die Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch Schimmelpilze wird als Ergebnis vorliegender Untersuchungen am besten durch das Verhalten von Asp. niger W. II. dargestellt (Tabelle V).

Aus der Tabelle V geht hervor, daß *freie* Säuren, und zwar Essig- und selbst Äpfelsäure, ungünstig und sogar schädlich auf das Mycelwachstum und die Umbildung des Acetats in Citronensäure wirken. Eine geringe Zuckermenge ist für das Mycelwachstum und die Acetatumbildung besonders vorteilhaft, ein Zusatz von *Malat* dagegen hat vor allem auf die Umbildung des Acetats in Citronensäure und auf die Hemmung der Oxalsäurebildung einen positiven Einfluß. Die Gegenwart von Acetat allein bewirkt, daß die Essigsäure langsam in Äpfelsäure übergeht und eine große Neigung zu einem kürzeren oxydativen Übergang zu Oxalsäure besitzt. Die Neigung ändert sich jedoch sofort, sobald eine, wenn auch nur geringe Menge von Zucker und besonders von Malat + Zucker hinzugegeben wird.

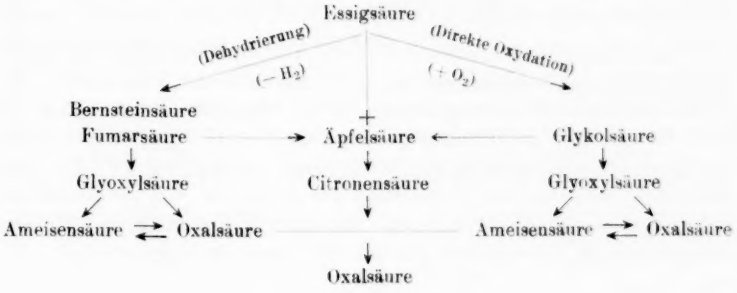
Tabelle V.

Nr.	Nährlösung	Zusatz zur Nährlösung	Mycelgewicht	Acetatverbrauch	Anhäufung von	
					Citronensäure	Oxalsäure
			g	%	g	g
1	4 % Ca-Acetat ohne Nährsalze	0,0	sehr schwach		Spuren	Spuren
2	Wie Nr. 1, aber mit Nährsalzen . . .	0,0	2,4	34	0,2818	0,8613
3	Wie Nr. 2	0,5 % Zucker	2,9	35	2,0706	0,4810
4	„ „ 2	1,0 % „	3,9	48	3,3708	0,7612
5	„ „ 2	0,1 bis 0,5 % Essigsäure	sehr schwach		Spuren	Spuren
6	„ „ 2	0,05 % Äpfelsäure	2,1	29	0,1326	0,5630
7	„ „ 2	0,5 % „	sehr schwach		0,0	0,0
8	„ „ 2	0,05 % Na-Malat	1,9	26	0,2104	0,3776
9	„ „ 2	0,5 % „	2,9	37	1,7118	0,3418
10	„ „ 2	0,5 % „ + 0,5 % Zucker	2,8	42	4,1232	Spuren

[1] Diese Zeitschr. **234**, 401, 1931. — [2] *T. Chrząszcz* u. *M. Zakomorny*, ebenda **259**, 156, 1933; **263**, 105, 1933.

Für die Bildung der Oxalsäure kommen hier Zwischenprodukte mit zwei C-Atomen in Frage, wie Essig-, Glykol- und Glyoxylsäure, sowie indirekt über Fumarsäure auch die Ameisensäure. So erklärt sich leicht die Anhäufung der Oxalsäure in den verschiedenen Stadien der Essigsäureumbildung.

Unter Berücksichtigung unserer früheren Untersuchungen können wir also jetzt zeigen, daß diese Umbildung der Essigsäure grundsätzlich in zwei Richtungen nach folgendem Schema vor sich geht:



Ergebnisse.

Untersuchungen über den Einfluß der l-Äpfelsäure auf die Anhäufung der Citronensäure in 4%iger Ca-Acetatlösung mit Nährsalzen durch Schimmelpilze führten zu folgenden Ergebnissen:

1. l-Äpfelsäure, die als Na-Malat zugesetzt wird, zeigt einen vorteilhaften Einfluß auf die Umbildung der Essigsäure in Citronensäure. Dieser Einfluß ist demjenigen eines Zuckerzusatzes fast gleich.

2. Freie, zur Acetatnährlösung zugesetzte Äpfelsäure hat auf die Anhäufung der Citronensäure einen ungünstigen Einfluß und ist in Mengen von 0,5% schädlich. Freie Essigsäure ist unter diesen Bedingungen schon in einer Menge von 0,1% schädlich.

3. Der Zusatz eines Gemisches von 0,5% Äpfelsäure (Na-Malat) + 0,5% Zucker hat auf die Anhäufung der Citronensäure sogar einen besseren Einfluß als ein zweimal so großer Zusatz (2%) von Zucker allein. In diesem Falle beträgt die Menge der angehäuften Citronensäure etwa 50% des gesamten verarbeiteten Acetats.

Essig- und Äpfelsäure sind demnach diejenigen Umbildungsprodukte, über welche gemäß unserer Theorie die Bildung der Citronensäure aus Zucker vor sich geht.

4. Die Fähigkeit, Essigsäure zu Citronensäure umzubilden, ist ein individuelles Artmerkmal der Schimmelpilze; dabei lassen diejenigen Schimmelpilzarten, die größere Citronensäuremengen aus Zucker anhäufen, diese Fähigkeit auch bei der Acetatumbildung erkennen.

Beeinflussung der Fettwanderung durch Jodessigsäure und Nebennierenexstirpation.

Von

L. Laszt und **F. Verzár.**

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Basel.)

(Eingegangen am 14. März 1936.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Hemmung der Fettresorption durch Jodessigsäure und durch Exstirpation der Nebennieren, die durch Aufheben der Fettsynthese im Schleimhautepithel zustandekommt (1) (2), legte die Frage nahe, ob auch die der „Fettwanderung" zugrundeliegenden Prozesse des intermediären Fettstoffwechsels ähnlich gehemmt werden können. Ein viel untersuchter Fall ist die Wanderung des Fettes aus den Fettdepots in die Leber bei Phosphorvergiftung. Wir untersuchten deshalb, ob diese Fettwanderung sich ähnlich wie die Resorption beeinflussen läßt.

Methodik.

Zu den Versuchen wurden Ratten mit einem Körpergewicht von etwa 180 g benutzt. Sie wurden einmal täglich entweder mit dem fettarmen Futter A oder dem fettreichen Futter B ad libitum gefüttert.

Diät A war das Normalfutter für Ratten: 150 g Reis werden mit 150 g Milch und etwas Wasser zu einem Reisbrei gekocht, dann gibt man ein Gemisch folgender Zusammensetzung dazu: Fleischmehl 25 g, Roggenmehl 25 g, Maismehl 50 g, Weizengrahammehl 50 g, Trockenhefe 3 g, Salzgemisch (*Mc Collum* Nr. 185) 8 g. Dazu kommt noch 10 g Lebertran. Alles wird gut vermischt. Der Fettgehalt beträgt 2,6%. Diät B hatte dieselbe Zusammensetzung, nur wurde noch 20% Kokosfett dazugemischt, so daß der Fettgehalt 22,6% war. Als Diät C wird bezeichnet, wenn die Tiere nur in einer Vorperiode Diät B erhielten, während der Vergiftung aber Diät A.

Zur P-Vergiftung erhielten die Ratten täglich 0,5 mg P in 0,1 ccm Olivenöl gelöst, das subcutan eingegeben wurde. Nachdem die Tiere diese Dosis 5 oder 6 Tage lang erhalten hatten, wurden sie mit Kopfschlag getötet, das Gewicht der Leber bestimmt und diese sogleich auf den Gesamtfettgehalt analysiert.

Die Fettbestimmung wurde auf die folgende Weise ausgeführt: Die Leber wird im Mörser mit Quarzsand verrieben und dann mit etwa 40 ccm Alkohol-Äther (3 : 1) übergossen und 24 Stunden stehengelassen. Nun wird auf dem Wasserbad aufgekocht und filtriert. Der Rückstand wird noch dreimal mit Alkohol-Äther und einmal mit Äther nachgespült. Das Filtrat wird eingedampft, der Rückstand mit Äther aufgenommen und nach Zugabe einer Messerspitze Natriumsulfat in ein abgewogenes Gefäß filtriert. Das Filtrat wird eingedampft und das Gefäß mit Rückstand bis zur Gewichtskonstanz gewogen.

In den Versuchsreihen I, II, VIII, XVI und XVII wurde jede Leber einzeln analysiert. Nach dem Vorgang von *Best* und Mitarbeitern (3) sind wir in den anderen Serien so vorgegangen, daß wir mehrere, meist fünf Tiere, in einer Gruppe zusammen gleich behandelten und ihre Lebern gemeinsam analysierten. Diese Werte sind also gemittelt.

Versuche

1. Einfluß der Diät auf die Fettleber.

Normale Ratten zeigen bei gemischter Nahrung (Diät A) in der Leber (Tabelle I) einen Fettgehalt von 4,70 % (Versuchsreihe I, sechs Tiere). Vergiftet man die Tiere mit P, so beträgt der Fettgehalt 6,69 % (Versuchsreihe II, acht Tiere) (Tabelle II).

Tabelle I. Versuchsreihe I. Fettgehalt der Leber bei normalen Tieren.

Versuchstier Nr.	Lebergewicht Nr.	Gesamt-Ätherrückstand %
1	4,137	4,63
2	5,040	4,65
29	6,997	5,85
30	6,387	5,25
34	5,717	4,18
35	5,328	3,67
Mittel:	5,601	4,70

Tabelle II. Versuchsreihe II. Fettgehalt der Leber bei normalen mit Phosphor vergifteten Tieren.

Versuchstier Nr.	Lebergewicht Nr.	Gesamt-Ätherrückstand %	Anmerkung
6	4,854	7,88	0,5 mg P pro Tag, 6 Tage lang, dann Tötung.
7	6,645	6,08	
8	8,062	6,63	
18	6,445	6,57	
19	6,229	6,17	
23	6,546	7,88	
24	7,294	6,08	
26	9,130	6,25	
Mittel:	6,900	6,69	

Eine stärkere Fettleber kann man erhalten, wenn man die Tiere 14 Tage vor der P-Vergiftung und während derselben mit einer fettreichen Nahrung füttert (Diät B: Grundnahrung mit Zugabe von 20 %

Tabelle III. Fettgehalt der Leber.

Versuchsreihe	Behandlung: Normal %	Behandlung: P vergiftet 5 Tage	Behandlung: 5 Tage nach der Vergiftung	Diät	Zahl der Tiere
I	4,70			A	6
II		6,69		A	8
V		7,86		C	5
VI		7,06		C	5
VII		7,16		C	2
X			5,15	C	5
XXIV	4,98			B	5
III		12,00		B	5
IV			12,20	B	5

Kokosfett) (Tabelle III). Normale Tiere zeigten nun einen Fettgehalt von 4,98 % (Versuchsreihe XXIV, fünf Tiere). Vergiftet man jetzt mit P, so enthalten die Lebern 12,0 % Fett (Versuchsreihe III, fünf Tiere). In einer weiteren Versuchsreihe, in welcher nach der fünftägigen Vergiftung noch 5 Tage gewartet wurde, auch 12,2 % (Versuchsreihe IV, fünf Tiere). Macht man die Versuche aber so, daß die Tiere nur in einer Vorperiode von 14 Tagen auf der fettreichen Diät gehalten werden, aber während der P-Vergiftung selbst die fettarme Diät erhalten (Diät C), dann ist die Fettleber wieder geringer: In Versuchsreihe V (fünf Tiere) 7,86 %, in Versuchsreihe VI (fünf Tiere) 7,06 %, in Versuchsreihe VII (zwei Tiere) 7,16 %. 5 Tage später hatte aber der Fettgehalt wieder auf 5,15 % abgenommen (Versuchsreihe X). Tabelle III enthält die Mittelwerte dieser Versuchsreihen.

Bei allen mit P vergifteten Tieren, deren Leberfett also zwischen 6,69 und 12,2 % lag, wurde schon makroskopisch eine deutliche „Fettleber" diagnostiziert. In Generaltabelle XI sind auch die Gewichte der Lebern angegeben. Daraus läßt sich auch die absolute Fettmenge der Lebern berechnen, die dort auch angegeben ist.

Zusammenfassend (s. Tabelle III und XI) erhielten wir also bei normalen Tieren 4,70 % bzw. 4,98 % Leberfett; bei fünf- bis sechstägiger P-Vergiftung bei 2,6 % Fettgehalt des Futters 6,69 %, bei einem Fettgehalt des Futters von 22,6 % nur vor der Vergiftung 7,06 bis 7,86 % und bei einem Fettgehalt der Nahrung von 22,6 % vor und auch während der Vergiftung 12,0 bis 12,2 % Leberfett. Demnach hängt die Höhe des Fettgehaltes der Leber bei der Phosphorvergiftung besonders davon ab, ob auch während der Vergiftung die Nahrung fettreich ist. Während bei Tieren, die zwar ein gutes subcutanes Fettdepot besitzen, aber fettarme Nahrung bekamen, wie in Versuchsreihe II, die Fettzunahme der Leber + 1,99 % (189 mg) bzw. in den Versuchsreihen V bis VII + 2,36 bis + 3,16 % (235 bis 314 mg) war, ist in der Versuchsreihe III und IV die Zunahme bis + 7,5 % (443 bis 491 mg), d. h. es wurde mehr als zweimal soviel Fett in der Leber aufgestapelt. Davon könnten also etwa 5 % in der Form gewesen sein, in der das Fett während der Fettresorption wandert.

2. Wirkung der Jodessigsäure.

In der Versuchsreihe VIII (Tabelle IV) wurden die Tiere chronisch mit Monojodessigsäure vergiftet, die im Verhältnis 1 : 5000 zu ihrer Nahrung gemischt wurde. Sie waren mit der fettarmen Diät A ernährt. Nachdem die Jodessigsäurevergiftung 14 Tage gedauert hatte, wurde, während auch weiter mit Jodessigsäure vergiftet wurde, auf dieselbe Weise wie bei den obigen Serien mit Phosphor vergiftet. Weder makroskopisch noch chemisch war eine Fettleber zu bemerken. Der Fettgehalt der Lebern war im Mittel sogar etwas niedriger als der von normalen

Tabelle IV. Versuchsreihe VIII.

Fettgehalt der Leber bei chronisch mit Monojodessigsäure vergifteten Tieren nach Phosphorvergiftung.

Versuchstier Nr.	Lebergewicht g	Gesamt-Ätherrückstand %	Anmerkung
3	6,235	5,61	14 Tage vorher Monojodessigsäure 1 : 5000 mit der Nahrung. Dann erst mit der Phosphorvergiftung begonnen. 0,5 g P pro Tag, 6 Tage lang.
4	5,767	4,26	
5	7,468	4,42	
15	3,078	3,02	
16	4,779	3,04	
17	4,460	2,89	
22	6,826	4,45	
25	7,512	4,93	
Mittel:	5,765	4,08	

(4,08 %, Mittel von acht Tieren). Zum Vergleich haben wir die Versuchsreihe XVIII so ausgeführt, daß vier Tiere 2 Wochen lang nur mit Jodessigsäure vergiftet und dann getötet wurden. Der Fettgehalt der Lebern war 4,10 %. Die Resultate sind in Tabelle V zusammengestellt.

In der Versuchsreihe IX wurde die fettreiche Diät in der Vorperiode von 14 Tagen gegeben, dann wurde die fettarme Diät gegeben und mit P und gleichzeitig auch mit Jodessigsäure vergiftet, indem diese im Verhältnis von 1 : 1000 der Nahrung zugemischt wurde. Auch jetzt entwickelten sich keine Fettlebern. Im Mittel von vier Tieren fanden wir in der Leber 5,55 % Fett; das ist etwas mehr als bei den normalen Tieren der Versuchsreihe I, aber wesentlich weniger als bei den ebenso gefütterten und mit P vergifteten Tieren der Versuchsreihen V, VI und VII, welche die Parallelen waren. Auch hier wurde eine weitere Serie von vier Tieren (Versuchsreihe XIX) eingeschaltet, in welcher diese bei derselben Ernährung nicht mit P, jedoch an den letzten fünf Tagen mit Jodessigsäure vergiftet wurden. Ihre Leber enthielt 4,80 % Fett.

Tabelle V. Fettgehalt der Leber in %.

Versuchsreihe	Diät	P-vergiftet	P-vergiftet und mit Jodessigsäure	Nur mit Jodessigsäure	Versuchsreihe	Diät	P-vergiftet	P-vergiftet und mit Jodessigsäure	Nur mit Jodessigsäure
II	A	6,69	—	—	VI	C	7,06	—	—
VIII	A	—	4,08	—	VII	C	7,16	—	—
XVIII	A	—	—	4,10	IX	C	—	5,55	—
V	C	7,86	—	—	XIX	C	—	—	4,80

Zusammenfassend (s. Tabelle V) kann gesagt werden, daß Jodessigsäurevergiftung die Entstehung der Fettleber bei Phosphorvergiftung vollkommen hemmt. Es wurden Werte von 4,08 bis 5,55 % Fett ge-

funden, gegenüber 4,70 % bei normalen und 6,69 bis 7,86 % bei ebenso gefütterten und mit P vergifteten Tieren.

3. Abwandern des Fettes aus der Phosphorleber.

Nicht nur das Einwandern des Fettes in die Leber, sondern auch das Abwandern aus derselben wird durch Jodessigsäure gehemmt. Tabelle VI zeigt das. Bei Tieren, die, wie oben bereits erwähnt, auf Diät C gehalten waren, betrug der Fettgehalt der Leber nach fünftägiger

Tabelle VI.

Versuchsreihe	Zahl der Tiere	Fettgehalt der Leber in %		
		Ende der P-Vergiftung	5 Tage nach Ende der P-Vergiftung	5 Tage nach P-Vergiftung mit Monojodessigsäure behandelt
V	5	7,86	—	—
VI	5	7,06	—	—
VII	2	7,16	—	—
X	5	—	5,15	—
XXII	4	—	5,12	—
XXIII	4	—	—	6,05

P-Vergiftung 7,06 bis 7,86 % und nahm während weiterer 5 Tage nach der Vergiftung auf 5,15 bis 5,12 % ab. Wurde aber in Versuchsreihe XXIII während dieser Nachperiode noch 1 : 1000 Jodessigsäure zur Nahrung gemischt, so nahm das Fett weniger ab, nur auf 6,05 %.

4. Fettleber bei Hungern und Beeinflussung durch Jodessigsäure.

Jodessigsäure hemmt die Fettresorption (1). Es wäre deshalb möglich, daß der Mangel einer P-Fettleber so zu erklären ist, daß die Tiere kein Fett zur Verfügung hatten. Nachdem in der Versuchsreihe III und IV der große Einfluß des während der P-Vergiftung resorbierten Fettes auf die Entwicklung der Fettleber gezeigt worden ist, scheint es möglich, daß die Jodessigsäurehemmung der Fettleber sich nur aus der Resorptionshemmung erklärt. Es wurde deshalb auch nicht für nötig erachtet, eine weitere Versuchsreihe einzuschalten, in welcher nicht nur vor, sondern auch während der Phosphorvergiftung mit der fettreichen Diät ernährt wurde, denn deren Resorption wäre ohnehin durch die Jodessigsäure gehemmt.

Andererseits ist aber bekannt, daß eine Fettleber sich auch dann entwickelt, wenn das Tier hungert. Es wurde deshalb untersucht, ob Jodessigsäure auch das Entstehen der Hunger-Fettleber verhindert. Tabelle VII zeigt diese Versuche. In Versuchsreihe XX wurden fünf Tiere nach siebentägigem Hungern (nur Wasser) getötet. Sie zeigten 6,57 % Leberfett, das ist etwa 2 % mehr als bei normalen Tieren. Im

Gegensatz zu den meisten Fällen von P-Vergiftung ist bei den Hungerfettlebern die Leber nicht vergrößert gewesen (s. Tabelle XI). In Versuchsreihe XXI wurden dann neun Tiere während dem siebentägigen Hungern mit Jodessigsäure so vergiftet, daß diese im Verhältnis 1 : 5000 zu dem Trinkwasser hinzugemischt wurde. Der Fettgehalt der Lebern war 4,95 %.

Demnach hemmt Jodessigsäure auch die Entwicklung der Fettleber beim Hungern, ebenso wie am gefütterten Tier bei Phosphorvergiftung. Damit ist auch bewiesen, daß nicht etwa die Hemmung der Fettresorption, sondern tatsächlich das Einwandern des Fettes in die Leber durch die Jodessigsäure aufgehoben wird.

Tabelle VII.

Versuchsreihe	Normaltiere	Hungertiere	Hungertiere mit Jodessigsäure vergiftet	Zahl der Tiere
I	4,70	—	—	6
XX	—	6,57	—	5
XXI	—	—	4,95	9

5. Wirkung der Nebennierenentfernung auf die Entwicklung der Fettleber bei Phosphorvergiftung.

Ähnlich wie Jodessigsäurevergiftung hemmt auch Nebennierenexstirpation die Fettresorption (1) (2). In Versuchsreihe XVI und XVII haben wir deshalb den Einfluß der Nebennierenexstirpation auf die Entwicklung einer Fettleber nach P-Vergiftung untersucht.

In Versuchsreihe XVI (Tabelle VIII) wurden fünf Tieren, die mit der Normaldiät A gefüttert waren, die Nebennieren entfernt. Als

Tabelle VIII. Versuchsreihe XVI.
Fettgehalt der Leber von nebennierenlosen Tieren.

Versuchstier Nr.	Lebergewicht g	Gesamt-Ätherrückstand %	Anmerkung
12	4,569	6,33	Leberentnahme am 7. Tag nach der Exstirpation der Nebennieren.
13	5,660	5,40	
14	4,796	4,92	
27	5,643	4,55	Leberentnahme am 4. Tag nach der Exstirpation der Nebennieren.
28	5,308	5,75	
Mittel:	5,195	5,39	

Mittelwert wurde in der Leber 5,39 % Fett gefunden. Zwei Tiere wurden am vierten, drei am siebenten Tage nach der doppelseitigen Nebennierenexstirpation getötet. Die Befunde waren die gleichen.

In Versuchsreihe XVII (Tabelle IX) wurden sieben Tieren, die mit der Diät A ernährt waren, die Nebennieren exstirpiert und fünf Tiere

Tabelle IX. Versuchsreihe XVII.
Fettgehalt der Leber von nebennierenlosen Tieren, mit Phosphor vergiftet.

Versuchstier Nr.	Lebergewicht g	Gesamt-Ätherrückstand %	Anmerkung
9	6,215	5,90	0,5 mg P pro Tag vom 1. Tag nach der Exstirpation der Nebennieren, 6 Tage lang.
10	4,414	6,54	
11	6,451	6,23	
20	5,458	4,03	
21	5,469	5,53	
31	6,897	4,00	0,5 mg P pro Tag vom 4. Tag nach der Exstirpation der Nebennieren, 6 Tage lang.
32	8,560	4,57	
Mittel:	6,209	5,25	

vom ersten Tage danach 6 Tage lang, zwei Tiere vom vierten Tag danach 6 Tage lang in gewohnter Weise täglich mit Phosphor vergiftet. Es hat sich mindestens in vier Fällen keine, aber auch in den drei anderen kaum eine Fettleber entwickelt. Auch makroskopisch war keine Fettleber zu erkennen. Alle Werte liegen in denselben Grenzen wie bei unvergifteten nebennierenlosen Tieren. Der Fettgehalt der Leber war im Mittel bei diesen sieben Tieren 5,25 %. Ohne Nebennierenexstirpation bekamen ebenso ernährte Tiere Fettlebern mit 6,69 % Fett (Versuchsreihe II).

Die Wirkung der Jodessigsäurevergiftung und der Nebennierenexstirpation auf die Fettresorption besteht bekanntlich darin, daß beide die Fettresorption verhindern. Nun zeigt sich, daß sie auch auf die Entwicklung der Fettleber bei P-Vergiftung in gleicher Weise wirken. Das scheint besonders dann der Fall zu sein, wenn man mit der P-Vergiftung erst anfängt, wenn die Folgen der Nebennierenexstirpation deutlich sind, also nach dem vierten Tage. Auf Grund der Analogie mit der Resorptionsbeeinflussung wird man annehmen dürfen, daß auch hier die Rinde der Nebenniere der beeinflussende Teil ist. Das müßte allerdings noch durch Substitution mit Rindenhormon geprüft werden.

6. Wirkung von Cholin auf die Entwicklung von Fettleber.

Best (3) und Mitarbeiter haben in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, daß Cholin einen Einfluß auf die Entwicklung der Fettleber bei Phosphorvergiftung hat. Insbesondere zeigten sie, daß das Verschwinden des Fettes aus der Leber, wenn man nach 5 oder 6 Tagen aufgehört hat mit P zu vergiften, von dem Cholingehalt der Nahrung beeinflußt wird.

Wir wiederholten zuerst ihre Versuche und untersuchten dann, ob der Cholineffekt durch Jodessigsäure beeinflußt werden kann. Zur Wiederholung des Versuchs von *Best* wurden die in Tabelle X zusammengestellten Versuchsreihen ausgeführt. [In allen drei Reihen erhielten

die Tiere dasselbe Futter B (mit 20 % Kokosfett) in der Vorperiode, aber nicht während der fünftägigen Phosphorvergiftung.]

In den *Versuchsreihen V, VI, VII* war — wie oben erwähnt — am Ende einer fünftägigen Vergiftung der Fettgehalt der Leber 7,06 bis 7,86 %.

Tabelle X. Fettgehalt der Lebern bei Cholin- und Jodessigsäurewirkung nach P-Vergiftung.

Versuchsreihe	Nur P-vergiftet Leberfett %	Versuchsreihe	Nach 5 Tagen Leberfett %	Versuchsreihe	Mit Cholin in der Nachperiode (bzw. * auch während der Vergiftung) Leberfett %	Versuchsreihe	Mit Cholin und Jodessigsäure in der Nachperiode Leberfett %	Diät
(V)	7,86	X	5,15	(XI)	4,75	(XV)	5,43	C
(VI u. VII)	7,06–7,16	XXII	5,12	(XIII*)	5,64	(XIV)	6,87	C
(III)	12,0	IV	12,2	(XII)	7,00	(XIV b)	4,95	B

In der *Versuchsreihe X* war die Behandlung genau dieselbe, nur warteten wir noch weitere 5 Tage. Jetzt war das Fett aus der Leber wieder verschwunden, der Fettgehalt war nunmehr 5,15 % und in der ebenso ausgeführten Versuchsreihe XXII 5,12 %.

In der *Versuchsreihe XI* wurde ebenfalls nach der fünftägigen P-Vergiftung noch 5 Tage gewartet. Genau wie in der vorigen Versuchsreihe wurde während der Vergiftung und in dieser Nachperiode die fettarme Diät gefüttert. Jedoch wurde jetzt der Nahrung noch 2 % Cholin (nach *Best*) hinzugesetzt. Der Fettgehalt der Lebern war jetzt 4,75 %. Sowohl ohne wie mit Cholin hatte sich also die Fettleber in gleicher Weise zurückgebildet.

Wurde während der fünftägigen Phosphorvergiftung (nicht nachher, wie oben!) 2 % Cholin zur Nahrung gesetzt, so entwickelte sich keine Fettleber. In dieser *Versuchsreihe XIII* (vier Tiere) war der Fettgehalt nur 5,64 %, kaum höher als bei normalen Tieren. Es scheint also, daß Cholin das Entstehen der Phosphorfettleber verhindert.

Diese Versuche wurden dann so wiederholt, daß während der Phosphorvergiftung und auch in der fünftägigen Nachperiode die fettreiche Diät (mit 20 % Kokosfett) gegeben wurde. Jetzt war das Resultat ganz anders. In der auf dieselbe Weise durchgeführten parallelen *Versuchsreihe III* war nach fünftägiger P-Vergiftung 12,0 % Fett in der Leber vorhanden.

In *Versuchsreihe IV* haben wir noch weitere 5 Tage gewartet und weiter mit der fettreichen Diät gefüttert. Die Fettleber blieb bestehen. Der Fettgehalt betrug immer noch 12,2 %.

Derselbe Versuch in *Versuchsreihe XII* so ausgeführt, daß in der Nachperiode von 5 Tagen zur Nahrung noch 2% Cholin hinzugefügt wurde, führte aber zu einer sehr wesentlichen Abnahme des Fettgehaltes der Leber: Fettgehalt 7,0%. Demnach ist ebenso wie bei der Entwicklung der Fettleber, so auch bezüglich ihres Verschwindens wesentlich, ob in der Nachperiode die Nahrung fettreich ist. Nach unseren Versuchen verschwindet nur in letzterem Falle unter dem Einfluß des Cholins das Fett der Fettleber rascher.

7. Wirkung von Jodessigsäure auf den Cholineffekt.

In *Versuchsreihe XV*, (welche parallel zu Versuchsreihe V, X, XI ist), sind fünf Tiere mit Diät C ernährt. In der fünftägigen Nachperiode (also nicht während der P-Vergiftung wie in der vorigen Versuchsreihe) erhielten sie 2% Cholin und 1 : 1000 Jodessigsäure mit der Nahrung. Der Fettgehalt der Leber war 5,43%. Bei den nur mit Phosphor vergifteten Tieren war sogleich nach der 5 Tageperiode 7,86% (Versuchsreihe V) und bei den nur mit Cholin in der Nachperiode behandelten (Versuchsreihe XI) 4,75% Fett vorhanden. Man könnte die Jodessigsäurewirkung also eventuell als eine teilweise Hemmung des Cholineffekts deuten.

In *Versuchsreihe XIV*, (welche parallel zu Versuchsreihe VI, VII, XXII, XIII ausgeführt wurde), sind vier Tiere mit Diät C ernährt. Während der Phosphorvergiftung wurde auch 2% Cholin zur Nahrung gegeben (so wie in Versuchsreihe XIII), aber ferner noch 1 : 1000 Jodessigsäure. Nach fünftägiger Vergiftung war der Fettgehalt 6,87%, es war also eine Fettleber vorhanden, die ebenso groß ist, wie bei den nur mit Phosphor vergifteten Paralleltieren der Versuchsreihe VI und VII. Weder Cholin noch Jodessigsäure, die sonst die Fettleber verhindern, haben hier gewirkt.

Dagegen ist in der dritten Reihe der Tabelle X, wo der Cholineffekt sehr deutlich war [gegenüber 12,2% (Versuchsreihe IV), wurde nur 7% (Versuchsreihe XII) Fett gefunden], durch Jodessigsäure der Cholineffekt nicht aufgehoben, sondern sogar verstärkt worden, wie *Versuchsreihe XIVb* zeigt, in welcher nur 4,95% Fett gefunden wurde.

Die Beeinflussung des Cholineffekts durch Jodessigsäure war also ganz wechselnd und muß weiter untersucht werden, ehe irgendwelche Folgerungen gezogen werden können.

Diskussion.

Die vorhergehend beschriebenen Versuche, die sich auf Analysen von 128 Tieren stützen, sind in der Generaltabelle XI zusammengefaßt. Hier sind außer den Prozentwerten des Fettgehaltes der Lebern auch noch die Lebergewichte und der Fettgehalt der Leber in g angegeben

Generaltabelle XI.

Versuchsreihe	Zahl der Tiere	Gewicht der Leber g	Leberfett %	Leberfett g	Behandlung
I	6	5,60	4,70	0,262	Normale Tiere. A-Diät.
II	8	6,90	6,69	0,451	P vergiftet. A-Diät.
III	5	5,89	12,00	0,705	P vergiftet. B-Diät.
IV	5	6,18	12,20	0,753	5 Tage nach P-Vergiftung. B-Diät.
V	5	7,33	7,86	0,576	P vergiftet, C Diät.
VI	5	7,04	7,06	0,497	P „ C „
VII	2	7,13	7,16	0,512	P „ C „
VIII	8	5,77	4,08	0,235	P „ + JE vergiftet. Diät A.
IX	4	6,37	5,55	0,351	P „ + JE „ „ C.
X	5	6,64	5,15	0,341	5 Tage nach der P-Vergiftung.
XI	5	6,70	4,75	0,318	Cholin in der Nachperiode. Diät C.
XII	5	6,14	7,00	0,430	„ „ „ „ B
XIII	4	5,25	5,64	0.297	„ während der Vergiftung. „ C.
XIV	4	5,69	6,87	0,391	Cholin + JE. Diät C.
XIV b	5	4,86	4,95	0,241	„ + „ „ B.
XV	5	6,10	5,43	0,337	„ + „ „ C.
XVI	5	5,195	5,39	0,279	Nebennierenlose Tiere.
XVII	7	6,21	5,25	0,326	„ + P-Vergiftung.
XVIII	4	5,90	4,10	0,242	Nur JE. Diät A.
XIX	4	6,51	4,80	0,313	„ JE. „ C.
XX	5	5,36	6,57	0,353	Hungertiere.
XXI	9	5,06	4,95	0,251	„ mit JE.
XXII	4	6,30	5,12	0,323	5 Tage nach P-Vergiftung.
XXIII	4	6,18	6,05	0,374	5 „ „ „ + JE.
XXIV	5	6,52	4,98	0,325	Normale Tiere. B-Diät.

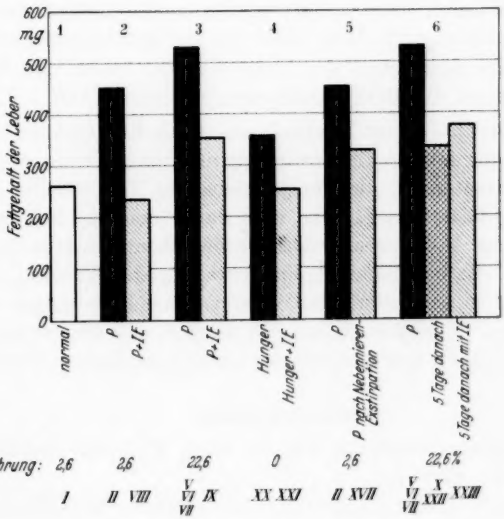


Abb. 1.

Die obigen Resultate, welche auf Grund der Prozentwerte besprochen wurden, werden so noch deutlicher. Das geht besonders auch aus der Abb. 1 hervor, welche die Resultate nach Gesamtfettgehalt wiedergibt.

Es ergibt sich, daß

1. Vergiftung mit Jodessigsäure die Entwicklung der Fettleber bei P-Vergiftung verhindert (Abb. 1, 2 und 3) und

2. nach Nebennierenexstirpation ebenfalls die Fettleber nach P-Vergiftung nicht zustandekommt (Abb. 1, 5).

Es kann das nicht so erklärt werden, daß in beiden Fällen wegen Hemmung der Fettresorption keine Fettleber entsteht, denn

3. auch Hungertiere bekommen Fettlebern, deren Entstehen ebenfalls durch Jodessigsäure gehemmt wird (Abb. 1, 4).

Deshalb scheint es begründet zu sein, das Fehlen der Fettlebern in beiden Fällen darauf zurückzuführen, daß die Fettwanderung in die Leber nicht stattfindet.

Nachdem die Erklärung der Wirkung der Jodessigsäure und der Nebennierenexstirpation bezüglich der Resorptionshemmung die war, daß die Synthese aus Fettsäuren über Phosphatide zu Neutralfetten aufgehoben ist (1) (2), muß man daran denken, daß auch die Mobilisierung des Fettes bei der Fettwanderung in die Leber bei P-Vergiftung mit ähnlichen Prozessen verbunden ist. Es sei nur an die Untersuchungen von *Miescher* (4), *Bloor* (5), *Leites* (6) und anderen erinnert, die auch daran dachten, daß das Fett in Form von Phosphatiden (Lecithin) wandert. Wenn die Phosphatidbildung in den Depots als Vorbedingung des Transportes durch Jodessigsäurevergiftung oder durch Nebennierenentfernung gehemmt wird, dann bleibt die Fettwanderung aus.

4. Auch das Abwandern des Fettes aus der Leber nach der Vergiftung wird durch die Monojodessigsäure gehemmt (Abb. 1, 6).

Wir hofften über diesen Mechanismus durch Kombinieren der Jodessigsäurewirkung mit der Cholinwirkung näheres zu erfahren, da nach *Best* und Mitarbeitern (3) die Phosphorleber ihr Fett rascher entleert, wenn Cholin gefüttert wird. Man muß daran denken, daß damit die Synthese des zur Mobilisierung nötigen Zwischenproduktes (Lecithin) gefördert wird. Bezüglich des Cholineffekts war die Wirkung der Jodessigsäure aber so wechselnd, daß vorerst keine Folgerungen gezogen werden können. Es muß auch bedacht werden, daß die dreifache Vergiftung mit P, Cholin und Jodessigsäure sehr komplizierte Verhältnisse schafft.

Zusammenfassung.

1. Jodessigsäurevergiftung hemmt nach Phosphorvergiftung die Entwicklung der Fettleber.

2. Sie hemmt auch das Entstehen der Fettleber beim Hungern.

3. Auch das Abwandern des Fettes aus der Leber nach der P-Vergiftung wird durch Jodessigsäure gehemmt.

4. Exstirpierung der Nebennieren bewirkt ebenfalls, daß nach P-Vergiftung keine Fettleber entsteht.

5. Daraus wird gefolgert, daß Fett, um in die Leber zu wandern, in Phosphatide umgewandelt wird, und daß auch dieser intermediäre Vorgang des Fettstoffwechsels unter dem hormonalen Einfluß der Nebennierenrinde steht, ähnlich wie die Fettsynthese in der Darmschleimhaut bei dem Resorptionsprozeß.

Literatur.

1) *F. Verzár* u. *L. Laszt*, diese Zeitschr. **270**, 351, 1934. — 2) *Dieselben*, ebenda **276**, 11, 1935; **278**, 396, 1935. — 3) *H. C. Best* u. *J. M. Hershey*, J. of Physiol. **75**, 49, 1932; *C. H. Best, J. M. Hershey* u. *M. Elinor Huntsman*, ebenda **75**, 56, 1932; *C. H. Best* u. *M. Elinor Huntsman*, ebenda **75**, 405, 1932; *C. H. Best* u. *Jessie H. Ridout*, ebenda **78**, 415, 1933; *C. H. Best* u. *Elinor Huntsman*, ebenda **83**, 255, 1935; *C. H. Best, D. L. Maclean* u. *Jessie H. Ridout*, ebenda **83**, 275, 1935. — 4) *F. Miescher*, Gesammelte Arbeiten S. 321. — 5) *W. R. Bloor*, J. of biol. Chem. **24**, 447, 1916. — 6) *S. Leites*, diese Zeitschr. **184**, 273, 1927.

Mikrohydrierung mit Hydrosulfit.

Von **Erwin Haas.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. März 1936.)

In den Hauptraum eines kegelförmigen manometrischen Meßgefäßes gibt man wässerige Bicarbonatlösung, in die Ansatzbirne I Natriumhydrosulfit, in die Ansatzbirne II die zu prüfende Substanz. Der Gasraum enthält Kohlensäure, verdünnt mit einem indifferenten Gas, z. B. mit Argon. Ist die Temperatur ausgeglichen, so holt man zunächst das Hydrosulfit, das im Überschuß gegen die zu prüfende Substanz ist, in den Hauptraum herüber, wobei aus verschiedenen Gründen eine geringe Druckänderung auftritt. Dann holt man die zu prüfende Substanz in den Hauptraum herüber. Wird die Substanz von Hydrosulfit reduziert, so tritt ein positiver Druck auf. Denn aus Hydrosulfit entsteht, wenn es reduzierend wirkt, saures Sulfit, das aus dem Bicarbonat Kohlensäure austreibt und dabei selbst in neutrales Sulfit übergeht.

Mit dieser Methode[1] kann man feststellen, ob eine Substanz von Hydrosulfit reduziert wird und wieviel Wasserstoff sie dabei addiert. Hat beispielsweise die Substanz das Molekulargewicht 200 und addiert sie 2 Atome Wasserstoff, so treibt bei der Reduktion 1 mg der Substanz

$$\frac{44\,800}{200} = 224 \text{ cmm}$$

Kohlensäure aus. $^1/_4$ mg Substanz genügt also zur Messung. Die Methode ist nicht minder empfindlich, wie die früher von hier angegebene Methode[2] der Mikrohydrierung mit Palladium oder Platin und Wasserstoff. Ich habe die Methode, die bisher nur bei der Untersuchung des wasserstoffübertragenden Co-Ferments angewandt wurde, auf Vorschlag von Herrn *Otto Warburg* in einigen einfachen Fällen geprüft.

Gleichung der Reduktion.

Reagiert molekularer Sauerstoff mit Hydrosulfit, so entstehen saures Sulfit und saures Sulfat in äquivalentem Verhältnis[3]:

$$Na_2S_2O_4 + H_2O + O_2 = NaHSO_3 + NaHSO_4.$$

Würden auch bei anaeroben Reaktionen des Hydrosulfits Sulfit und Sulfat entstehen, so wäre die Gleichung:

$$Na_2S_2O_4 + 3\,H_2O = NaHSO_3 + NaHSO_4 + 4\,H.$$

[1] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **282**, 157, 1935, insbes. S. 191. — [2] *O. Warburg, E. Negelein* u. *E. Haas*, ebenda **227**, 171, 1930; mit Platin, ebenda **282**, 157, 1935, insbes. S. 195. — [3] *I. Meyer*, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **34**, 56, 1903.

H. Franzen und *P. Stieldorf* fanden jedoch[1], daß bei der Wirkung von Hydrosulfit auf Azokörper (die dabei zu den beiden entsprechenden Aminen reduziert werden), kein Sulfat, sondern nur Sulfit entsteht. Die Reaktionsgleichung in diesem Falle war:

$$Na_2S_2O_4 + 2\,H_2O = 2\,NaHSO_3 + 2\,H. \qquad (1)$$

Auch in den von mir untersuchten Fällen war die Reaktionsgleichung die Gleichung (1).

Anmerkung. Manche Substanzen, z. B. Chinone, die durch Hydrosulfit reduziert werden, werden auch durch Sulfit reduziert, so daß man sich fragen kann, ob nicht in solchen Fällen das nach Gleichung (1) entstandene Sulfit weiter reagiert und dem Hydrosulfit als Reduktionsmittel Konkurrenz macht. Das Hydrosulfit reagiert jedoch, insbesondere wenn es im Überschuß ist, schneller als das Sulfit.

Austreibung von Kohlensäure durch saures Sulfit.

Verläuft Reaktion (1) in Bicarbonatlösung, so folgt auf (1) die Reaktion

$$2\,NaHSO_3 + 2\,NaHCO_3 = 2\,Na_2SO_3 + 2\,H_2O + 2\,CO_2. \qquad (2)$$

Addiert man (1) und (2), so erhält man

$$Na_2S_2O_4 + 2\,NaHCO_3 = 2\,Na_2SO_3 + 2\,CO_2 + 2\,H, \qquad (3)$$

d. h. ein Molekül ausgetriebener Kohlensäure würde den Verbrauch von 1 Atom Wasserstoff anzeigen, wenn die Reaktion (2) vollständig von links nach rechts verliefe, wenn außer saurem Sulfit (vgl. den nächsten Abschnitt) keine anderen Säuren entstehen würden und wenn die „Retention der Kohlensäure" durch CO_3^{--} zu vernachlässigen wäre.

Bei meinen Versuchen war die Bicarbonatlösung 1 %ig. Der Gasraum enthielt bei Beginn der Messungen 6 Vol.-% Kohlensäure (in Argon) und nach erfolgter Reaktion etwa 7 % Kohlensäure. Dann war die Wasserstoffionenkonzentration, gemessen mit der Glaselektrode

$$H^+ = 1{,}53 \cdot 10^{-8}\ \text{Mole/Liter}.$$

Gibt man bei dieser Wasserstoffionenkonzentration saures Sulfit (in die Ansatzbirne eingewogen als $K_2S_2O_5$) in die Bicarbonatlösung, so werden 85 % der äquivalenten Menge Kohlensäure ausgetrieben; gibt man Salzsäure in die Bicarbonatlösung, so werden 92 % der äquivalenten Menge Kohlensäure ausgetrieben. Entsteht also in der Reaktionslösung eine starke Säure, z. B. HCl, so erhält man ihre Menge in cmm, indem man die ausgetriebene CO_2 mit 1/0,92 multipliziert. Entsteht in der Reaktionslösung die schwache Säure HSO_3^-, so erhält man ihre Menge in cmm, indem man die ausgetriebene CO_2 mit 1/0,85 multipliziert.

Anmerkung. Wenn bei $H^+ = 1{,}53 \cdot 10^{-8}\ \frac{\text{Mole}}{\text{Liter}}$ HSO_3^- 85 % der berechneten CO_2-Menge austreibt, so ist der Dissoziationsrest ϱ der HSO_3^-

$$1 - \frac{0{,}85}{0{,}92} = 0{,}08$$

[1] *H. Franzen* u. *P. Stieldorf*, J. f. prakt. Chem. **76** (2), 467, 1907.

und die Dissoziationskonstante K_{HSO_3} der HSO_3^-

$$K_{HSO_3} = H^+ \cdot \frac{1-\varrho}{\varrho} = 1{,}53 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{0{,}92}{0{,}08} = 18 \cdot 10^{-8} \text{ Mole/Liter.}$$

K_{HSO_3} ist die zweite Dissoziationskonstante der schwefligen Säure. Im allgemeinen wird angenommen, daß K_{HSO_3} viel größer ist ($\sim 10^{-2}$). Einen meinem Wert nahekommenden ($10 \cdot 10^{-8}$) fand *I. M. Kolthoff*[1].

Austreibung von Kohlensäure durch andere Säuren.

Reduziert man das Chlorid des Methylenblaus zur Leucoverbindung, so wird pro Mol Farbstoff ein Mol Salzsäure frei[2], weil die Leucoverbindung eine sehr schwache Base ist.

Reduziert man Indigodisulfosäure zur Leucoverbindung, so entsteht[3] im Indigomolekül eine Säuregruppe der Dissoziationskonstante $5 \cdot 10^{-8}$ Mole/Liter.

Wird also eine Substanz in Bicarbonatlösung durch Hydrosulfit reduziert, so ist zu berücksichtigen, daß außer saurem Sulfit andere Säuren entstehen können, die Kohlensäure austreiben.

Prüfsubstanzen

waren Methylenblau, Indigodisulfosäure und Helianthin.

Methylenblau war das Chlorid (für medizinische Zwecke) der Firma *C. Merck*. Die Analyse stimmte auf $C_{16}H_{18}N_3SCl + 5\,H_2O$. Die Substanz wurde in diesem Zustand in die Birne eingewogen, von der Einwaage wurde das Gewicht des Wassers abgezogen.

Indigodisulfosaures Natrium stellte Herr Dr. *Miescher* in dem Laboratorium der Gesellschaft für chemische Industrie, Basel, freundlichst für uns her. Die Substanz verlor beim Trocknen im Hochvakuum bei 60° 9,3 % Wasser und gab dann den berechneten Stickstoffwert (ber. für $C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$ 6,01 %, gefunden 6,1 %).

Helianthin war ein Handelspräparat, das 60 % des Farbstoffes $C_{14}H_{14}N_3O_3SNa$ enthielt.

Die Versuchsanordnung

sowie die Herstellung der Natriumhydrosulfitlösung sind früher beschrieben[4]. Abgeändert wurde nur die Konzentration des Bicarbonats (1 % statt 0,2 %).

Methylenblau.

$C_{16}H_{18}N_3SCl$, Molekulargewicht 319.

Hauptraum: 3 ccm 1 %iges $NaHCO_3$. *Birne I*: 3 mg $Na_2S_2O_4$ in 0,2 ccm 1 %igem $NaHCO_3$. *Birne II*: 0,78 mg Methylenblau ($C_{16}H_{18}N_3SCl$) in 0,2 ccm Wasser.

Gasraum: 6 Vol.-% CO_2 in Argon. Temperatur 20°.

---

[1] *I. M. Kolthoff*, Chem. Centralbl. **1919**, IV, 808. — [2] Vgl. *Albert Reid*, diese Zeitschr. **242**, 159, 1931. — [3] *M. X. Sullivan, Barnett Cohen* u. *W. Mansfield Clark*, Hygien. Labor. Bull. Nr. 151, S. 57, Washington 1928. — [4] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **282**, 157, 1935, insbes. S. 191.

Zuerst wurde das Hydrosulfit in den Hauptraum eingekippt. Beim Einkippen des Methylenblaus wurden in 15 Minuten 141 cmm Kohlensäure entwickelt (Endwert), die Lösung war gelblich.

Von den 141 cmm CO_2 sind $\frac{0{,}78 \cdot 0{,}92}{319} \cdot 22400 = 50$ cmm von der bei der Reduktion freiwerdenden HCl ausgetrieben. $141 - 50 = 91$ cmm CO_2 sind durch Sulfit ausgetrieben, müssen also mit $\frac{1}{0{,}85}$ multipliziert werden. $\frac{91}{0{,}85} = 107$ cmm HSO_3^-, das sind 1,96 Mole HSO_3^- pro Mol Farbstoff. 2 Atome H sind addiert.

Indigodisulfosaures Natrium.

$C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$, Molekulargewicht 466.

Anordnung wie bei dem Versuch mit Methylenblau, aber in Birne II: 1,36 mg Farbstoff $C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$.

Beim Einkippen des Farbstoffes wurden in 15 Minuten 154 cmm Kohlensäure entwickelt (Endwert), die Lösung war dann gelblich.

Die bei der Reduktion im Indigo entstehende Säuregruppe hat eine Dissoziationskonstante von $5 \cdot 10^{-8}$ Mole/Liter. Bei $H = 1{,}53 \cdot 10^{-8}$ Mole pro Liter ist der Dissoziationsrest dieser Säure

$$\varrho = \frac{1{,}53 \cdot 10^{-8}}{(1{,}53 + 5) \cdot 10^{-8}} = 0{,}235.$$

Von den 154 cmm CO_2 sind

$$\frac{1{,}36 \cdot 0{,}92}{466} \cdot 22400 \cdot (1 - 0{,}235) = 46 \text{ ccm}$$

von der bei Reduktion im Indigomolekül entstehenden Säure ausgetrieben. $154 - 46 = 108$ cmm CO_2 sind durch Sulfit ausgetrieben, müssen also mit $\frac{1}{0{,}85}$ multipliziert werden. $\frac{108}{0{,}85} = 127$ cmm HSO_3^-, das sind 1,95 Mole HSO_3^- pro Mol Farbstoff. 2 Atome H sind addiert.

Helianthin.

$C_{14}H_{14}N_3O_3SNa$, Molekulargewicht 327.

Anordnung wie bei dem Versuch mit Methylenblau, aber in Birne II: 0,9 mg Farbstoff $C_{14}H_{14}N_3O_3SNa$.

Beim Einkippen des Farbstoffes wurden in 15 Minuten 218 cmm Kohlensäure entwickelt (Endwert), die Lösung war dann entfärbt.

In diesem Falle (Reduktion der Azogruppe zu zwei primären Aminen) entsteht außer dem sauren Sulfit keine saure Substanz. Wir korrigieren die entwickelte Kohlensäure durch Multiplikation mit dem Faktor $\frac{1}{0{,}85}$ und erhalten $\frac{218}{0{,}85} = 257$ cmm HSO_3^-, das sind 4,15 Mole HSO_3^- pro Mol Farbstoff. 4 Atome H sind addiert.

Das Ergebnis

ist, daß, wenn man die Sekundärreaktionen berücksichtigt, aus der ausgetriebenen Kohlensäure die Zahl der addierten H-Atome berechnet werden kann.

Über phosphorhaltige Lipoide aus humanen Tuberkelbazillen.

Von

K. Bloch.

(Aus dem Schweizerischen Forschungsinstitut in Davos, Pathologisch-anatomische und Bakteriologische Abteilung.)

(Eingegangen am 20. März 1936.)

Die Versuche, durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus der Leibessubstanz säurefester Bakterien Fette und Lipoide zu isolieren, gehen bis in das Jahr 1890 zurück. Schon damals stellte *Hammerschlag* (1) das Vorhandensein von Phosphor in ätherischen Auszügen von Tuberkelbazillen fest. In der Folgezeit hat sich eine große Anzahl von Forschern mit den fettartigen Leibesbestandteilen dieser Bakterien beschäftigt, besonders im Hinblick auf die charakteristischen Eigenschaften sowohl der pathogenen Tuberkelbazillen wie der nichtpathogenen Säurefesten (Timotheegras-, Smegmabazillen), nämlich einerseits dem hohen Fett- bzw. Lipoidgehalt und andererseits der Beständigkeit der mit Anilinfarbstoffen gefärbten Bakterien gegenüber Salzsäure-Alkohol, die der Gruppe ihren Namen verliehen hat. Die Arbeiten früherer Jahre lieferten jedoch durchaus uneinheitliche Resultate, erklärlich wegen der Schwierigkeit, ausreichende Materialmengen zu beschaffen und der Nichtbeachtung von streng einheitlichen Züchtungs- und Extraktionsbedingungen der Bakterien. Erst in den letzten Jahren sind in großem Maßstab und in systematischer Weise Untersuchungen angestellt worden, und zwar mit Bakterien, die stets unter gleichen Bedingungen auf künstlichen Nährböden gezüchtet wurden. Die wichtigsten Arbeiten auf diesem Gebiet sind die von *R. J. Anderson* und seiner Schule (2), dem es gelang, durch fraktionierte Extraktion mit organischen Lösungsmitteln eine Anzahl hinreichend definierter fett- und lipoidartiger Substanzen aus Tuberkelbazillen zu isolieren. *Anderson* unterteilt diese in Fett-, Phosphatid- und Wachsfraktion.

Außer diesen Untersuchungen sind aus der neueren Zeit noch die Arbeiten von *Macheboeuf* (3) und von *Dessy* und *Francioli* (4) zu erwähnen, deren Ergebnisse jedoch für die chemische Erforschung der Bakterienlipoide von geringem Wert sind. Es kam bei *Macheboeuf* ein Gemenge von humanen und bovinen Tuberkelbazillen zur Aufarbeitung, das zur Abtötung der Keime Temperaturen von über 100° ausgesetzt worden war, was eine Intaktheit des ursprünglichen Materials nicht mehr gewährleistet. *Dessy* und *Francioli* stellten eine sehr große Anzahl, durch verschiedene Löslichkeitseigenschaften voneinander getrennte Fraktionen dar, von denen aber keine als im chemischen Sinne wohldefiniert angesehen werden darf.

Die Untersuchungen, über die hier berichtet wird, beschäftigten sich mit dem nach *Anderson* dargestellten und von ihm *A 3-Phosphatid* genannten phosphorhaltigen Lipoid aus frischen, nicht abgetöteten humanen Tuberkelbazillen. Dieser Körper, der sich in seinen Eigenschaften und seiner chemischen Zusammensetzung in erheblichem Maße als von den bisher bekannten Phosphatiden Lecithin, Kephalin, Sphingomyelin verschieden erwies, nimmt in bezug auf seine biologische

Wirksamkeit eine Sonderstellung unter den Leibessubstanzen der säurefesten Bakterien ein.

Spritzt man nämlich im Tierversuch intraperitoneal [*Sabin*, *Doan* und *Forkner* (5)] oder intracutan [*Roulet* (6)] die nach *Anderson* isolierten Fraktionen aus humanen Tuberkelbazillen: Neutralfett, Phosphatid, Wachs, ferner wasserlösliches Kohlenhydrat und Eiweiß in Form von wässerigen Lösungen bzw. Aufschwemmungen, so besitzt allein die Phosphatidfraktion eine ganz spezifische Reizwirkung. Das gesunde Tier reagiert darauf nicht nur mit der Bildung eines Fremdkörpergranuloms, sondern das A 3-Phosphatid vermag das für die Tuberkulose typische Epitheloidzellengranulom zu erzeugen; es treten weiterhin sogenannte *Langhans*sche Riesenzellen auf, bis schließlich nach etwa 30 Tagen Nekrose und Verkäsung des Gewebes erfolgt. Man erhält also im histologischen Bild einen für die Tuberkulose durchaus charakteristischen Befund. Daraus ist zu schließen, daß „die Entstehung eines Tuberkels, d. h. des morphologischen Ausdrucks der Gewebsschädigung durch Tuberkelbazillen vom Faktor ‚Leben' der Keime weitgehend unabhängig ist". (*Roulet*, l. c.) Es ist bemerkenswert, daß bei der Prüfung einer Anzahl Organlipoide wie Lecithin, Kephalin, Sphingomyelin hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit gleichsinnige Reaktionen nicht erhalten werden können, so daß dem A 3-Phosphatid aus Tuberkelbazillen eine ganz spezifische Reizwirkung zuerkannt werden muß. *Sabin* und Mitarbeiter (7), die die Hydrolysenprodukte des A 3-Phosphatids im gleichen Versuch prüften, sprechen der d-Phtionsäure, einer flüssigen, gesättigten Fettsäure, die isomer mit Cerotinsäure ist, diese Reizwirkung zu; nach *Roulet* haben die von der d-Phtionsäure hervorgerufenen Infiltrate jedoch mehr das Gepräge von unspezifischen Fremdkörperwirkungen.

Im Zusammenhang hiermit stehen Versuche, die *Roulet* und ich am hiesigen Institut mit einer Reihe von Fettsäuren angestellt haben. Es wurden dabei folgende Substanzen in wässerigen Emulsionen (1 mg in 0,1 ccm) Kaninchen intracutan gespritzt: Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Ricinolsäure, Erucasäure, Chaulmoograsäure und ein Fettsäurengemisch, das durch Hydrolyse von A 3-Phosphatid gewonnen worden war. Die Wahl dieser Fettsäuren erfolgte unter dem Gesichtspunkt, den Einfluß der Kettenlänge, des Sättigungsgrades, der Ringstruktur (Chaulmoograsäure) im Zusammenhang mit der beschriebenen Reizwirkung zu untersuchen. Mit Ausnahme des Fettsäurengemisches aus A 3-Phosphatid zeigte keine der angeführten Substanzen eine deutlich ausgeprägte Reizwirkung, und auch die von dem Phosphatidfettsäurengemisch hervorgerufenen Gewebsveränderungen hatten durchaus unspezifischen Charakter; d. h. es entstand eine mehr oder weniger ausgeprägte entzündliche Infiltration der Haut, ohne daß Epitheloidzellen in Knötchengruppen oder gar Riesenzellen aufgetreten wären. Aus diesen Beobachtungen darf abgeleitet werden, daß die spezifische Reizwirkung des A 3-Phosphatids nicht lediglich seinem Gehalt an bestimmten Fettsäuren wie Phtionsäure zuzuschreiben ist, sondern daß sie in der Struktur des Phosphatidmoleküls, in noch nicht geklärter Weise, begründet sein muß.

Um bei der Extraktion von Tuberkelbazillen vergleichbare Resultate zu erhalten, ist es unerläßlich, die Bakterien stets unter gleichen Bedingungen zu züchten. Da lediglich bei der von *Anderson* angewendeten Methodik sowohl die Einheitlichkeit des Extraktionsmaterials — es

wurden stets Kulturen des humanen Stammes H 37, die auf *Long*schem Nährboden gezüchtet waren, aufgearbeitet —, wie auch dessen weitgehendste Schonung durch ausschließliches Arbeiten in CO_2-Atmosphäre und Anwendung von Temperaturen nicht über 35°, gewährleistet war, wurde in unseren Untersuchungen dieses Schema (8) eingehalten.

Die von uns aufgearbeiteten Bazillenkulturen[1] wurden aus einem humanen Stamm auf *Lockemann*schem Nährboden gezüchtet, der sich von dem von *Anderson* benutzten *Long*schen Nährmedium nur geringfügig unterscheidet. (Beiden Nährböden ist gemeinsam, daß sie neben anorganischen Salzen lediglich Glycerin als Kohlenstoffquelle und Asparagin als Stickstoffquelle enthalten.) Es soll erwähnt werden, daß infolge der Schwierigkeit, Bakterien in großen Mengen zu beschaffen, uns bisher insgesamt nur 4 g Rohphosphatid zur Verfügung standen, da das Phosphatid selbst nur etwa 6 % der Leibessubstanz der Bakterien ausmacht.

Bei Anwendung des erwähnten Extraktionsschemas konnte die Reproduzierbarkeit der *Anderson*schen Ergebnisse im großen und ganzen bestätigt werden; einige Abweichungen führten jedoch später dazu, das A 3-Phosphatid gründlicher zu reinigen, als das bisher geschehen war. *Anderson* (9) erwähnt, daß die von ihm isolierten Fraktionen noch nicht den Anspruch auf völlige Reinheit erheben können; die fraktionierte Extraktion erweist sich nicht als ausreichend, um Fett, Phosphatid und Wachs voneinander und von Verunreinigungen in genügendem Maße zu trennen. Diese Schwierigkeiten kennzeichnen bekanntlich ganz allgemein die Lipoidchemie; gegenseitige Löslichkeitsbeeinflussung und Adsorptionserscheinungen, das häufige Fehlen von charakteristischem Schmelzpunkt und Kristallisationsvermögen erschweren die Reindarstellung von Lipoiden ganz außerordentlich. Über diese Verhältnisse wird in einer Arbeit von *E. Hecht* (10) ausführlich berichtet.

Die primären Äther-Alkoholextrakte der Bakterien sind noch sehr stark wasserhaltig und enthalten infolgedessen eine große Menge wasserlöslicher Kohlenhydrate. Daher haben wir nach einem Vorschlag von *Hecht* (11) der Äther-Alkoholextraktion eine mehrmalige Acetonbehandlung der Bakterien vorausgehen lassen. Man erreicht dadurch eine weitgehende Trocknung des Extraktionsmaterials, und gleichzeitig nimmt der Acetonextrakt den größten Teil des Neutralfettes auf, während nur verhältnismäßig geringe Mengen Phosphatid gelöst werden. Etwa 10 % des Gesamtphosphatids gehen in die Acetonextrakte, wohl unter dem Einfluß von Fett, obwohl Aceton ganz allgemein das Fällungsmittel für Phosphatide darstellt, und auch das A 3-Phosphatid im isolierten Zustande in Aceton völlig unlöslich ist. Diese mehrmalige

[1] Herrn Professor *R. Bieling*, *Behring*-Werke, sei an dieser Stelle für die Überlassung größerer Bakterienmengen herzlich gedankt.

Acetonbehandlung und die damit erzielte Entwässerung vermag jedoch nicht zu verhindern, daß die anschließenden Äther-Alkoholextrakte noch beträchtliche Mengen wasserlöslicher Kohlenhydrate enthalten, die sich nach dem Einengen und Ausäthern der zurückbleibenden Emulsion als ätherunlöslicher, gelber Sirup abscheiden. Diese Erscheinung demonstriert eine Eigenschaft der Lipoide, nämlich mit wasserlöslichen, ätherunlöslichen Substanzen, in diesem Falle Kohlenhydrat, in Lösung zu gehen. Die Alkohol-Ätherbehandlung in der Kälte bewirkt eine erschöpfende Extraktion des Phosphatids, es gelingt nicht, durch anschließendes Ausziehen mit den verschiedensten organischen Lösungsmitteln sowohl in der Kälte wie in der Wärme weitere Mengen phosphorhaltigen Lipoids in Lösung zu bringen.

Überblickt man die in den hervorragenden Arbeiten *Andersons* und seiner Schule verzeichneten Ergebnisse und vergleicht die Resultate, die bei der Hydrolyse von Fett, A 3-Phosphatid und Wachs erhalten werden, so ergibt sich folgendes Bild. Hydrolysenprodukte von:

Fett	A 3-Phosphatid	Wachs
Palmitinsäure	Palmitinsäure	Palmitinsäure
Stearinsäure	Oleinsäure	Stearinsäure
Tuberculostearinsäure	Tuberculostearinsäure	Tuberculostearinsäure
Linolsäure	Phtionsäure	Cerotinsäure
Linolensäure	Mannose	Phtionsäure
Phtionsäure	Inosit	Unverseifbares
Trehalose	Hexose	Inosit
	Glycerinphosphorsäure	Glucosamin
		d-Arabinose
		Galaktose
		Mannose

Es fällt auf, daß alle drei Fraktionen Zucker enthalten, und zwar anscheinend in chemischer Bindung, denn erst nach erfolgter saurer Verseifung wird *Fehling*sche Lösung von der wässerigen Hydrolysenflüssigkeit aller drei Fraktionen reduziert. Für das A 3-Phosphatid bedeutet sein Gehalt an Kohlenhydrat und das Fehlen einer organischen Stickstoffbase einen wichtigen Unterschied gegenüber den bisher bekannten Vertretern dieser Körperklasse. Es sind zwar in pflanzlichen und tierischen Phosphatiden, z. B. Jecorin, ebenfalls reduzierende Zucker aufgefunden worden, jedoch sind diese nicht als integrierende Bestandteile des Moleküls anzusehen, da sie durch Dialyse und andere Reinigungsverfahren zum Teil oder auch vollständig entfernt werden können. Ebenso würde der geringe Gehalt an Glycerinphosphorsäure (s. folgende Tabelle) zu dem Schluß führen, daß im A 3-Phosphatid die Fettsäuren nicht lediglich mit Glycerin verestert sein können, vorausgesetzt, daß ein reiner Körper vorliegt. Es handelt sich offenbar bei allen drei Fraktionen um Fett bzw. Lipoide, die sich grundsätzlich von den bisher aus tierischem oder pflanzlichem Material isolierten unterscheiden und außerdem in ihren biologischen Reaktionen eine Ausnahmestellung einnehmen.

Für die Zusammensetzung der Phosphatidfraktion gibt *Anderson* (12) folgende Zahlen an:

Ätherlöslicher Anteil	67 %
Palmitinsäure	30,5 %
Oleinsäure	12,8 %
Gesättigte, flüssige Fettsäuren	20,9 %
Wasserlöslicher Anteil	33,0 %
Mannose	9,2 %
Inosit	8,9 %
Andere Zucker	12,3 %
Glycerinphosphorsäure	5,4 %

N = 0,4 %
P = 2,3 %

Nach *Thierfelder-Klenk* (13) kann das N : P-Verhältnis als das geeignetste Kriterium für den Reinheitsgrad von Phosphatiden dienen. Nach den gleichen Autoren ist bisher nur die Existenz von

Lecithinen, Kephalinen	N : P = 1 : 1
Phosphatidsäuren	N-frei
Sphingomyelinen	N : P = 2 : 1

als gesichert anzunehmen. In der Literatur werden außerdem eine Anzahl von Phosphatiden wie Carnaubon, Cuorin, Protargon mit den verschiedensten N : P-Verhältnissen beschrieben, die sich aber später alle als Gemenge verschiedener Phosphatide untereinander oder als verunreinigt mit Abbauprodukten erwiesen haben. Das erwähnte Auftreten der gegenseitigen Löslichkeitsbeeinflussung erklärt die oft irrtümlich behauptete Isolierung von Phosphatiden mit einem anderen N : P-Verhältnis als 1 : 1 oder 2 : 1.

Das A 3-Phosphatid mit 0,4 % N und 2,3 % P weist das Verhältnis N : P = 1 : 2,9 auf. Man könnte also die wenig wahrscheinliche Existenz eines Monoaminotriphosphatids in Erwägung ziehen, wobei jedoch der geringe N-Gehalt ein sehr hohes Molekulargewicht verlangen würde. Zur Klärung dieser Frage wurden die bei der sauren Hydrolyse des Phosphatids auftretenden Spaltprodukte auf die Anwesenheit einer organischen Stickstoffbase untersucht. Hierbei konnte die Ansicht von Hecht (14) für das Phosphatid aus humanen und auch aus bovinen Tuberkelbazillen nicht bestätigt werden, derzufolge das Vorhandensein von Cholin auf Grund des biologischen Nachweises mit Acetylcholin und mittels des Dimorphismus von Cholinplatinchlorid als erwiesen angesehen wird. Zur Nachprüfung wurde 1 g des nach *Anderson* hergestellten Phosphatids, das die von diesem Autor angegebenen Eigenschaften aufwies, bei 210° schmolz und neben 0,52 % N 2,7 % P* enthielt, mit n HCl hydrolysiert. Aus der wässerigen Hydrolysenflüssigkeit konnte mit Goldchlorid kein Niederschlag von Cholin- oder Colamin-

* Die Mikro-*Kjeldahl*-Bestimmungen wurden nach der Methode von *Bang* ausgeführt, die Phosphorbestimmungen nach dem *Embden*schen Strychnin-Molybdatverfahren.

goldsalz erhalten werden. Ebenso war mit Hilfe der äußerst empfindlichen Methode von *W. Roman* (15), die eine quantitative Bestimmung des Cholins als Cholinperjodid noch in einer Menge von 10 γ gestattet, keine Spur Cholin nachweisbar. Die Brauchbarkeit der *Roman*schen Methode war mit Cholinchlorid in Substanz und mit Cholin, das aus der Hydrolyse von Eilecithin (*Merck*) stammte, bestätigt worden.

Nachdem diese Versuche das Fehlen einer organischen Stickstoffbase erwiesen hatten, wurde auf Grund der Angabe *Anderson*s die wässerige Hydrolysenflüssigkeit des A 3-Phosphatids auf Ammoniak geprüft. Bei alkalischer Destillation und Titration des Destillats bzw. Kolorimetrieren mit *Nessler*-Reagens wurden nun 85% des Gesamtstickstoffs als Ammoniak gefunden. Daß nur 85% des Gesamtstickstoffs in Form von NH_3 nachweisbar waren, kann zum Teil auf die Eigenschaft der bei der Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren, hartnäckig Stickstoff festzuhalten [*Koganei* (16)], zurückgeführt werden. Auch wir fanden stets etwa 5% des Gesamtstickstoffs in den Fettsäuren enthalten. Andererseits ist die Stickstofffrage für das A 3-Phosphatid von geringer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, daß der N-Gehalt lediglich eine Verunreinigung darstellt. *Chargaff* (17) gibt der Meinung Ausdruck, daß der Platz, den im Lecithin das Cholin einnimmt, im Falle des A 3-Phosphatids mit NH_3 besetzt sei; jedoch würde auch diese Auffassung für das Phosphatid, nämlich als Ammonsalz einer Diglyceridphosphorsäure, ein Verhältnis $N : P = 1 : 1$ verlangen.

Im Verlaufe der eigenen Untersuchungen war es aufgefallen, daß die genau nach der *Anderson*schen Vorschrift hergestellten Phosphatidpräparate nie die gleichen Analysenwerte für N und P zeigten, obwohl immer bei 210° schmelzende Substanzen erhalten werden konnten. So schwankten die N-Werte zwischen 0,3 und 0,6%. Es lag daher nahe, anzunehmen, daß ein noch stark verunreinigter Körper vorliegt. Es genügt offensichtlich nicht, die ätherische Phosphatidlösung mehrmals mit Wasser zu schütteln, um alle nichtätherlöslichen Verunreinigungen zu entfernen, ebenso wie mehrfaches Umfällen aus Ätherlösung mit Aceton nicht zum Ziel führt. Es erwies sich nun als vorteilhaft, das A 3-Phosphatid in Wasser von 35° quellen zu lassen und zur Unterstützung des Verteilungsgrades mehrere Stunden an der Turbine zu rühren, wobei zur Vermeidung von Luftoxydation im CO_2-Strom gearbeitet wurde. Die Emulsion wurde hierauf ausgeäthert und das Phosphatid aus der Ätherlösung mit Aceton ausgefällt. Die so erhaltene, rein weiße, pulverisierbare Substanz enthielt keine wesentlichen Mengen Stickstoff mehr, die Mikro-*Kjeldahl*-Bestimmung ergab Werte zwischen 0,05 und 0,1% N. Dagegen war der Phosphorgehalt angestiegen. In der durch Ausäthern von Phosphatid befreiten Waschflüssigkeit war Ammoniak deutlich nachweisbar. Hieraus geht hervor, daß der Stick-

stoffgehalt des A 3-Phosphatids lediglich eine Verunreinigung darstellt, und zwar in Form von Ammonsalz, das aus der Nährflüssigkeit der Bakterienkulturen mitgeschleppt wurde.

Stickstofffreie Phosphatide sind aus den Untersuchungen von *Chibnall* und *Channon* (18) bekannt. Diese Autoren isolierten aus dem Cytoplasma von Kohl- und Spinatblättern das Calciumsalz einer Diglyceridphosphorsäure, das mit verdünnter Säure in die freie Säure übergeführt wurde. Diese von den Verfassern als Phosphatidsäure bezeichnete Verbindung enthält 4,42% P und 0,11% N. Sie wird als intermediäres Produkt des Lecithinstoffwechsels angesehen. Stickstofffreie Phosphatide tierischer Herkunft sind dagegen bisher nicht bekannt.

Die für das gereinigte A 3-Phosphatid festgestellte N-Freiheit liefert wohl auch die Erklärung für das Fehlen einiger Eigenschaften, die für Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin charakteristisch sind. So sind mit A 3-Phosphatid keine Metallkomplexsalze, besonders mit Cadmiumchlorid und Platinchlorid erhältlich. Es stimmt in diesem Verhalten mit der Phosphatidsäure von *Channon* und *Chibnall* überein. Typisch für diese Phosphatide, die eine organische Stickstoffbase enthalten, ist ferner ihre Quellbarkeit in Wasser und die Bildung wässeriger Emulsionen. Damit im Zusammenhang steht die von *Virchow* entdeckte Bildung von Myelinfiguren, wenn man Phosphatide oder auch Cerebroside in Wasser quellen läßt. Das A 3-Phosphatid läßt sich nur sehr schwer in Wasser emulgieren; während Lecithin, mit Wasser verrührt, ohne Schwierigkeit klare und stabile kolloide Lösungen gibt, gelingt es mit A 3-Phosphatid kaum, wesentliche Mengen in eine wässerige Emulsion zu bringen. Erst nach innigem Verreiben des Materials unter tropfenweiser Zugabe von Wasser erhält man ziemlich grobe, trübe Aufschwemmungen, mit nur sehr geringer Konzentration an Phosphatid. Säuren und Salze verursachen sofort Ausflockung. Desgleichen konnte die Erscheinung der Myelinfiguren bei dem A 3-Phosphatid niemals beobachtet werden.

Nachdem das N : P-Verhältnis als Maßstab für die Reinheit des vorliegenden Körpers infolge der N-Freiheit ausschied, wurde der Höhe des Phosphorgehalts eine entscheidende Bedeutung zugemessen. Es soll erwähnt werden, daß die 6 bis 7 Wochen alten Bakterienkulturen in drei Anteilen aufgearbeitet wurden, und zwar jeweils der Inhalt von etwa 50 *Fernbach*-Kolben auf einmal. Bemerkenswerterweise gelang es nun nicht, trotz Anwendung der genau gleichen Arbeitsbedingungen, aus allen drei Bakterienportionen, die in verschiedenen Zeitabständen gezüchtet und extrahiert worden waren, ein Phosphatid mit dem gleichen P-Gehalt zu erhalten, und zwar lauteten die betreffenden Werte: 2,7, 2,0, 1,5% Phosphor. Aus den Arbeiten *Andersons* geht hervor, daß in seinem Laboratorium der Inhalt von 2000 *Fernbach*-Kolben auf einmal aufgearbeitet wurde, so daß der von ihm angeführte Wert von 2,3% P nur einen Durchschnittswert darstellt. Dieses Variieren klärte sich zwar in gewissem Sinne auf, als sich herausstellte, daß die durch Aceton aus Ätherlösung fällbare Substanz ein Gemenge dreier verschiedener Substanzen darstellt. Es erhebt sich aber trotzdem die anscheinend bisher noch nicht erörterte Frage, ob die Leibessubstanzen

der Bakterien tatsächlich eine konstante, stets reproduzierbare Zusammensetzung aufweisen. Es scheint jedenfalls nach unseren Beobachtungen nicht ausgeschlossen, daß trotz Anwendung der gleichen Züchtungsbedingungen zum mindesten das Verhältnis der einzelnen Bestandteile des Bazillenleibes Schwankungen aufweisen kann.

Das durch Wasserbehandlung gereinigte und von Stickstoff befreite Phosphatid enthielt nach Veraschung außer Phosphorsäure noch Magnesium. Deshalb wurde die ätherische Lösung des Phosphatids mehrere Male mit 1%iger Salzsäure behandelt. Das abgetrennte salzsaure Waschwasser enthielt nun beträchtliche Mengen Magnesium, das als $MgNH_4PO_4$ identifiziert wurde. Eine quantitative Bestimmung von Mg im A 3-Phosphatid konnte wegen Materialmangels nicht mehr ausgeführt werden. Es darf vielleicht geschlossen werden, daß das Magnesiumsalz einer Diglyceridphosphorsäure vorliegt, aus dem durch verdünnte Säure Mg abgespalten und die freie Säure gebildet wird. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß eine alkoholisch-ätherische Lösung des Phosphatids nach der Mg-Abspaltung bei der Titration mit alkoholischem Kali die doppelte Menge Alkali verbraucht wie vorher.

Die ätherische Phosphatidlösung wurde nach der Säurebehandlung mit dest. Wasser säurefrei gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und nach dem Einengen in die vier- bis fünffache Menge eiskalten Acetons eingetragen. Das Phosphatid (A) schied sicher wieder als weißer, flockiger Niederschlag ab und wurde abfiltriert und getrocknet.

Wurde nun die Fällungsmutterlauge eingeengt und Äther und Aceton im Vakuum abdestilliert, so hinterblieb ein schwach gelb gefärbtes Öl, das in Eiswasser erstarrte. Dieses Öl (B) ist in Äther, Petroläther und Chloroform leicht löslich, in Aceton nur in der Wärme. Läßt man die warme Acetonlösung abkühlen, so scheidet es sich als gelbweißer Niederschlag von schmieriger Konsistenz ab. Die Vermutung, daß es sich um mitgeschlepptes, acetonlösliches Fett handelte, bestätigte sich nicht und war auch unwahrscheinlich, nachdem das der Säurebehandlung unterworfene Phosphatid zuvor solange aus Ätherlösung mit Aceton umgefällt worden war, bis die Mutterlauge beim Eindunsten keinen Rückstand mehr hinterließ. Weiterhin wurde ein Phosphorgehalt von 2,44% festgestellt, so daß die Annahme, daß ein phosphatidartiger Körper vorliegt, gerechtfertigt ist. Die von dem Öl B gewonnene Menge betrug nur 200 mg, daher war eine weitgehende Reinigung nicht möglich. Der biologische Versuch, d. h. die auf S. 373 beschriebene Fähigkeit der Granulombildung, zeigte eine starke Aktivität des Öles B*. Der niedrige

* Über die biologischen Versuche soll demnächst an anderer Stelle berichtet werden.

P-Gehalt läßt vermuten, daß die Substanz noch stark verunreinigt ist. Sie konnte aus allen drei, getrennt aufgearbeiteten Bakterienportionen isoliert werden, und die hierbei angewendeten milden Bedingungen schließen wohl die Möglichkeit aus, daß außer der Abspaltung von Magnesium tiefere Eingriffe wie Hydrolyse in das Molekül des A 3-Phosphatids stattgefunden haben. Erst die Untersuchung größerer Materialmengen kann aber Aufschlüsse über die Natur dieses Körpers liefern.

100 mg des Öles B wurden mit n HCl unter Rückfluß hydrolysiert, wobei 60% Fettsäuren bzw. ätherlösliche Anteile erhalten wurden. Das Fettsäurengemisch war bei Raumtemperatur flüssig und erstarrte in Eiswasser. Die wässerige Hydrolysenflüssigkeit enthielt Glycerinphosphorsäure, Zucker war dagegen nicht nachweisbar.

Nach der Säurebehandlung wurde aus der Ätherlösung des Phosphatids, wie erwähnt, wiederum ein flockiger, weißer Phosphatidniederschlag erhalten (A), nachdem die eingeengte ätherische Lösung in überschüssiges Aceton eingetragen worden war. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen stellte die Substanz ein weißes, nicht hygroskopisches Pulver dar, dessen Phosphorgehalt gegenüber dem A 3-Phosphatid stets angestiegen war. Wird die Substanz A, oder wie sich später ergeben hat, auch das noch nicht der Säureeinwirkung unterworfene A 3-Phosphatid, mit Aceton von 30° behandelt, so geht ein Teil in Lösung; das Ungelöste blieb am Boden des Kolbens als weiße Paste zurück (A I). Nach mehrstündigem Digerieren mit warmem Aceton und Abgießen des Lösungsmittels wurde der Rückstand, der sich nicht in trockenem, dagegen leicht in wasserhaltigem Äther löste, aus der Ätherlösung mit Aceton gefällt. Die so erhaltene Substanz war gelblichweiß, bröckelig, schwer pulverisierbar und nicht hygroskopisch. Sie begann bei 165° zu sintern und war bei 175° durchgeschmolzen. Sie stellte das phosphorreichste bisher erhaltene Präparat dar und enthielt 3,55% organisch gebundenen Phosphor gegenüber 2,3% des *Anderson*schen Phosphatids. Bei der Aufarbeitung aller drei Bakterienportionen konnte zwar der P-Gehalt in dieser Fraktion um etwa ein Drittel gegenüber dem A 3-Phosphatid gesteigert werden, jedoch gelang es nicht, stets ein Produkt mit dem gleichen P-Gehalt zu isolieren. Das starke Variieren der P-Werte deutet darauf hin, daß auch das Phosphatid A I noch kein reiner Körper ist, jedoch darf die angegebene Fraktionierung als brauchbare Methode angesehen werden, um zu phosphorreicheren und damit reineren Produkten zu gelangen. 100 mg von A I wurden mit 5%iger Schwefelsäure hydrolysiert, die erhaltenen ätherlöslichen Anteile waren bei Zimmertemperatur fest. In der wässerigen Hydrolysenflüssigkeit war Glycerinphosphorsäure enthalten, die *Molisch*-Reaktion auf Kohlenhydrate war schwach positiv, dagegen erfolgte keine Reduktion von *Fehling*scher

Lösung. Da von A I ebenfalls nur etwa 200 mg zur Verfügung standen, war eine quantitative Bestimmung der Hydrolysenprodukte nicht möglich. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird für A I ebenfalls das Vorhandensein einer Phosphatidsäure angenommen. Eine Phosphatidsäure mit Palmitinsäure und Phtionsäure ($C_{26}H_{52}O_2$) als Fettsäurekomponenten würde ein Molekulargewicht von 788 besitzen und einen P-Gehalt von 3,93 %. A I mit 3,55 % P zeigt demnach schon eine gute Annäherung an den theoretischen Wert. Die durch Hydrolyse aus A I erhaltenen Fettsäuren haben einen höheren Schmelzpunkt als die des Öles B. Da *Anderson* (19) bei der Hydrolyse des A 3-Phosphatids vier Fettsäuren isolieren konnte, nämlich Palmitinsäure, Ölsäure, Tuberculostearinsäure und Phtionsäure, muß, wenn eine Diglyceridphosphorsäure zugrunde gelegt wird, ein Gemenge von mindestens zwei Phosphatiden vorliegen, die sich durch die in ihnen enthaltenen Fettsäuren unterscheiden. Aus diesem Grunde ist es wahrscheinlich, daß bei der Fraktion A I die festen gesättigten Fettsäuren vorwiegen, und im Falle des Öles B Ölsäure bzw. die flüssigen, gesättigten Fettsäuren Tuberculosterarinsäure und Phtionsäure den Hauptanteil der Fettsäuren bilden.

Beim Behandeln der Substanz A bzw. des A 3-Phosphatids mit Aceton von 30° war ein Teil gelöst worden. Beim Erkalten der Acetonlösung scheidet sich ein weißer Niederschlag ab, der nach dem Abfiltrieren und Trocknen ein rein weißes, amorphes Pulver darstellt (A II). Diese Substanz ist leicht löslich in Äther, Petroläther, Chloroform; in Alkohol und Aceton nur in der Wärme. Sie schmilzt nach mehrfachem Umlösen aus Aceton scharf bei 37°. A II enthält weder Phosphor noch Stickstoff und läßt sich durch zehnstündiges Erhitzen mit 5 %iger Schwefelsäure nicht verseifen. Beim Kochen mit alkoholischem Kali wird A II nicht gelöst und läßt sich aus der alkalischen Lösung mit Äther ausschütteln; demnach liegt keine freie Fettsäure vor. Die Sterinreaktionen sind negativ. Die Substanz hinterläßt beim Veraschen keinen Rückstand und liefert bei der Elementaranalyse folgende Werte: 13,39 % H, 80,51 % C. Ein Acetylprodukt konnte wegen Materialmangels noch nicht hergestellt werden. A II ist nicht mit dem von *Tamura* (20) beschriebenen Wachsalkohol Mykol identisch, von dem sie sich außer dem abweichenden Schmelzpunkt und der Zusammensetzung noch dadurch unterscheidet, daß sie nicht wie das Mykol die Eigenschaft der Säurefestigkeit bei der *Ziehl-Neelsen*-Färbung besitzt. Auch handelt es sich nicht um das von *Anderson* (21) als Bestandteil der Wachsfraktion erhaltene „Unverseifbare Wachs", das einen viel höheren Schmelzpunkt (57°) aufweist. Möglicherweise liegt der von *Bürger* (22) isolierte Alkohol $C_{19}H_{36}O$ vor, mit dem A II bezüglich Schmelzpunkt, Zusammensetzung und Löslichkeit ziemlich gut über-

einstimmt. Auf der Beimengung der unverseifbaren P-freien Substanz dürfte zum Teil das Schwanken des Phosphorgehalts der Phosphatidsäuren A I und B beruhen.

Der Kohlenhydratgehalt des A 3-Phosphatids.

Anderson gibt an, Mannose, Inosit und eine in ihrer Konstitution noch nicht aufgeklärte Hexose unter den Hydrolysenprodukten des A 3-Phosphatids gefunden zu haben. Als Lipoide, die Kohlenhydrate in chemischer Bindung enthalten, sind bisher nur die Cerebroside bekannt. Ferner wurde ein von *Drechsel* (23) aus Pferdeleber isoliertes und später aus verschiedenen Organen und Geweben dargestelltes Phosphatid, das Jecorin, als kohlenhydrathaltig bezeichnet. Da die von den verschiedenen Autoren erhaltenen Präparate stets wechselnde Mengen reduzierender Substanz aufwiesen, und sich diese nach *Meinertz* (24) durch Dialyse entfernen läßt, geben *Thierfelder* und *Klenk* (25) der Meinung Ausdruck, daß das Jecorin ein mit Kohlenhydrat und anorganischen Salzen verunreinigtes Kephalin sei. Auch im Falle des Jecorins wird also wieder die Fähigkeit der Phosphatide demonstriert, Zucker, Salze usw. zu adsorbieren. Gleiche Beobachtungen wurden bei pflanzlichen Phosphatiden gemacht. So führen *Winterstein* und *Hiestand* (26) die im Vergleich zur Theorie zu niedrigen Phosphorwerte bei Phosphatiden aus Cerealien auf das Vorhandensein von Zucker zurück. Durch Wasserbehandlung kann nur eine teilweise Entfernung des Kohlenhydrats erzielt werden [*Rewald* (27), *Bleyer* und *Diemair* (28)]. Wegen des starken Differierens der Zuckergehalte und der teilweisen Entfernbarkeit durch Wasser wird daher von diesen Autoren allgemein die Annahme vertreten, daß der Zucker nur als adsorbierte, fest anhaftende Beimengung vorliegt.

Das Phosphatid aus humanen Tuberkelbazillen enthält nach *Anderson* (29) 9,2 % Mannose, 8,9 % Inosit und 12,3 % andere Zucker, oder insgesamt 14 % reduzierende Substanz auf Glucose berechnet. *Anderson* erhielt bei der Hydrolyse mit alkoholischer Kalilauge aus dem A 3-Phosphatid ein Polysaccharid, Mannositose genannt, welches beim Kochen mit Säure gleiche Teile Mannose und Inosit lieferte; ferner eine Verbindung der Zusammensetzung $C_9H_{20}O_{14}P_2Ba_2$, die nach Säurehydrolyse *Fehling*sche Lösung reduziert. Es wird von *Anderson* angenommen, daß im Phosphatidmolekül Zuckerkomplexe mit Fettsäuren verestert sind, vor allem deshalb, weil der geringe Gehalt von 5,4 % Glycerinphosphorsäure nicht ausreicht, um die gesamten Fettsäuren (67 %) glyceridartig zu binden. Es würde sich also um Zuckerfette handeln, für deren Vorhandensein jedoch keine weiteren Beweisgründe angeführt werden, und deren Vorkommen bisher in der Literatur auch noch nicht beschrieben ist. Lediglich in einer Arbeit von *Bloor* (30) wird über synthetische Versuche berichtet, Mannit mit Stearinsäure zu kondensieren, wobei ein Distearat des Mannits erhalten wurde. Mit einer entsprechenden Hexose wurden die Versuche nicht ausgeführt.

Es wurde oben erwähnt, daß trotz vorangegangener Entwässerung durch Aceton die nachfolgenden Äther-Alkoholextrakte noch beträchtliche Mengen wasserlöslicher Kohlenhydrate enthalten, die sich beim Einengen abscheiden. Bei mehrmaligem Ausziehen mit den angegebenen Lösungsmitteln nahm nun die Menge der mitgelösten Kohlenhydrate

ab, und beim Einengen des dritten Extraktes, der noch beträchtliche Mengen Phosphatid enthielt, hinterblieb kein Kohlenhydrat mehr. In Verbindung damit wurde folgendes beobachtet. Ein aus dem ersten Auszug isoliertes Phosphatid — es handelte sich hier lediglich um A 3-Phosphatid, das noch nicht in die Fraktionen A I, A II und B zerlegt war — gab eindeutig positive Reaktionen auf Zucker, so die *Molisch*-Reaktion mit α-Naphthol und konz. Schwefelsäure in Substanz und nach saurer Hydrolyse Reduktion von *Fehling*scher Lösung. Hingegen zeigte ein aus dem dritten Extrakt isoliertes Präparat nach der Säurehydrolyse eine nur sehr schwache *Molisch*-Reaktion in der wässerigen Hydrolysenflüssigkeit, während die Reduktionsprobe gänzlich negativ ausfiel. Von letzterem Präparat wurden 150 mg mit 5%iger H_2SO_4 verseift; nach der Angabe *Anderson*s wären etwa 30% = 45 mg Zucker zu erwarten gewesen und infolgedessen eine positive Reduktionsprobe. In den übrigen Eigenschaften, wie Stickstofffreiheit, Schmelzpunkt, dagegen nicht im P-Gehalt, stimmten die beiden Präparate aus dem ersten und dritten Auszug überein. Leider stand nicht mehr genügend Substanz zur Verfügung, um das Absinken des Zuckergehalts quantitativ zu verfolgen. Der Versuch, durch eine Wasserbehandlung aus den kohlenhydratenthaltenden Phosphatidpräparaten eine Entfernung des Zuckers zu erzielen, war erfolglos.

Wenn Kohlenhydrat im Phosphatidmolekül chemisch gebunden ist, so besteht die Möglichkeit, daß die freien Hydroxylgruppen der Glyceridphosphorsäure mit Zucker verestert sind und demnach Zuckerphosphate vorliegen. Zur Prüfung dieser Frage schien die Spaltbarkeit durch Phosphatase geeignet. Es kam ein Phosphatasepräparat zur Anwendung, das nach einer Vorschrift von *Erdtmann* (31) aus Schweinenieren hergestellt wurde und welches Glycerophosphat zu 99% und Hexosediphosphat zu 84% aufspaltete. Die Einwirkung dieses Enzyms auf eine wässerige Emulsion von 0,2 g A 3-Phosphatid bei 37° und dem optimalen $p_H = 9{,}2$ hatte jedoch im Verlauf von 14 Tagen weder eine Abspaltung von Phosphorsäure noch von Zucker zur Folge.

Diese wenigen Beobachtungen können natürlich noch nicht die Frage entscheiden, wie der Zucker im Phosphatidmolekül gebunden ist. Es haben sich jedoch keine Anzeichen ergeben, die für eine echte chemische Bindung sprechen. Wahrscheinlicher ist es, daß, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen an pflanzlichen Phosphatiden, auch das A 3-Phosphatid bzw. die daraus abtrennbaren Fraktionen die Kohlenhydrate nicht in chemischer Bindung enthalten, sondern daß wechselnde Mengen Zucker die Phosphatide als fest anhaftende Beimengungen begleiten und von ihnen weder durch Umfällen noch durch Behandlung mit Wasser abgetrennt werden können. Weiterhin beweist die Tatsache, daß es gelang, Phosphatidpräparate mit einem P-Gehalt bis zu 3,55% P zu erhalten, und damit auch mit einem entsprechend

höheren Gehalt an Glycerinphosphorsäure, daß das Phosphatidmolekül nicht stets die gleiche Menge Kohlenhydrat enthalten kann; die Annahme einer chemischen Bindung des Zuckers im Phosphatidmolekül würde hiermit im Widerspruch stehen. Diese Erscheinung liefert jedenfalls eine weitere Erklärung für die Tatsache, daß es bisher nicht gelungen ist, den für Phosphatidsäuren zu erwartenden, theoretischen Phosphorwert zu erhalten.

Zusammenfassung.

Es wird das von *R. J. Anderson* beschriebene, als A 3-Phosphatid bezeichnete Lipoid aus humanen Tuberkelbazillen einer weiteren Untersuchung unterzogen. Da die Substanz keine organische Stickstoffbase enthält, kann keines der bekannten Monoaminophosphatide oder Sphingomyeline vorliegen. Der von *Anderson* angegebene Stickstoffgehalt von 0,4 % erweist sich als Verunreinigung durch Ammoniak bzw. Ammonsalz, das aus der Nährlösung der Bakterienkulturen adsorbiert wird.

Beim Behandeln des A 3-Phosphatids mit warmem Aceton läßt sich eine unverseifbare Substanz A II abtrennen; sie enthält weder Phosphor noch Stickstoff, schmilzt bei 37° und gibt keine Sterinreaktionen. Der Zusammensetzung nach dürfte es sich um einen Wachsalkohol handeln.

Die Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf das A 3-Phosphatid unter Bedingungen, die eine Hydrolyse ausschließen, führt zur Abspaltung von organisch gebundenem Magnesium. Hierauf können zwei verschiedene Phosphatide isoliert werden, von denen das eine (A I) in Aceton unlöslich ist, während das zweite (B) sich in warmem Aceton löst. Sie sind beide phosphorhaltig, und es wird angenommen, daß durch die Säurebehandlung die Magnesiumsalze von Diglyceridphosphorsäuren in die freien Diglyceridphosphorsäuren übergeführt wurden.

A I ist eine praktisch N-freie hochschmelzende Substanz, schwer pulverisierbar und nicht hygroskopisch. Der P-Gehalt konnte auf 3,55 % gesteigert werden, im Vergleich zu 2,3 % P des *Anderson*schen Phosphatids. Der im Vergleich zur Theorie zu niedrige P-Wert und die Tatsache, daß sich für ihn nicht immer die gleiche Höhe erreichen läßt, wird durch wechselnde Beimengungen von physikalisch adsorbiertem Kohlenhydrat und der P-freien unverseifbaren Substanz A II erklärt.

Das andere phosphorhaltige Lipoid B stellt ein bei Raumtemperatur flüssiges, schwach gelb gefärbtes Öl dar, mit 2,44 % P und weniger als 0,1 % N. Die Substanz B ist noch stark verunreinigt, worauf der im Vergleich zur Theorie zu niedrige P-Gehalt hinweist. Für B wird eine ähnliche Struktur wie für die Phosphatidsäure A I vermutet, mit dem

Unterschied, daß im Molekül von B die ungesättigten und gesättigten flüssigen Fettsäuren vorwiegen.

Bei subcutaner Applikation am gesunden Tier erzeugen die Phosphatide A I und B für die Tuberkulose charakteristische Granulome. Die Fraktion A II kam noch nicht zur Untersuchung.

Der Kohlenhydratgehalt des A 3-Phosphatids dürfte nicht chemisch an das Phosphatid gebunden sein.

Infolge der verhältnismäßig geringen Menge des zur Verfügung stehenden Materials mußte ich mich darauf beschränken, einige Gesichtspunkte bezüglich der Phosphatide aus Tuberkelbazillen anzugeben. Es ist beabsichtigt, sobald weiteres Untersuchungsmaterial verfügbar ist, noch die erforderlichen analytischen Daten beizubringen.

Literatur.

1) *A. Hammerschlag*, Mh. Chem. **10**, 9, 1890. — 2) *R. J. Anderson*, Phys. Rev. **12**, 166, 1932; *E. Chargaff*, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. XII, Teil 2, Heft 2, 1933. — 3) *Macheboeuf, Levy* u. *Fethke*, Ann. d. l'Inst. Pasteur Mars 1934, Tome XII, p. 277. — 4) *Dessy* u. *Franioli*, Bolletino dell' Istituto Sieroterapeutico Milanese, Fasc. VIII, Agosto 1934, XII. — 5) *Sabin, Doan* u. *Forkner*, J. of Exper. Med. **52**, Nr. 6, Suppl. Nr. 3. — 6) *Fr. Roulet*, Virchows Arch. **294**, 262, 1934. — 7) *Sabin*, l. c. — 8) *R. J. Anderson*, J. of biol. Chem. **74**, 525, 1927. — 9) *Derselbe*, Phys. Rev. **12**, 172, 1932. — 10) *E. Hecht*, Zeitschr. f. Tuberkulose **74**, 28, 1935. — 11) *Derselbe*, diese Zeitschr. **279**, 160, 1935. — 12) *R. J. Anderson*, Phys. Rev. **12**, 166 u. 175. — 13) *H. Thierfelder* u. *E. Klenk*, die Chemie der Phosphatide und Cerebroside, Berlin 1930. — 14) *E. Hecht*, diese Zeitschr. **279**, 157, 1935. — 15) *W. Roman*, ebenda **211**, 214, 1929. — 16) *R. Koganei*, J. of Biochem. **3**, 15, 1924. — 17) *E. Chargaff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **217**, 120, 1931. — 18) *A. C. Chibnall* u. *H. J. Channon*, Biochem. J. **21**, 231 u. 1112, 1927. — 19) *R. J. Anderson*, J. of biol. Chem. **23**, 169, 1929. — 20) *S. Tamura*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 85, 1913. — 21) *R. J. Anderson*, J. of biol. Chem. **83**, 505, 1929. — 22) *M. Bürger*, diese Zeitschr. **78**, 155, 1916. — 23) *E. Drechsel*, J. f. prakt. Chem. **33**, 425, 1886. — 24) *J. Meinertz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 371, 1905. — 25) *Thierfelder-Klenk*, l. c. S. 161. — 26) *E. Winterstein* u. *O. Hiestand*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 496, 1906. — 27) *B. Rewald*, diese Zeitschr. **211**, 199, 1929. — 28) *B. Bleyer* u. *W. Diemair*, ebenda **235**, 243, 1931. — 29) *R. J. Anderson*, Phys. Rev. **12**, 166, 1932. — 30) *W. R. Bloor*, J. of biol. Chem. **7**, 427, 1910; **11**, 141, 1912. — 31) *H. Erdtmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **172**, 182, 1927.

Zur Bestimmung von Glucosamin in Proteinstoffen.

Von

Ivar Nilsson.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala.)

(Eingegangen am 25. März 1936.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Da Glucosamin als Bestandteil von Proteinen weit verbreitet zu sein scheint, muß eine einfache Bestimmungsmethode für Glucosamin in Proteinen von Wert sein. *Elson* und *Morgan* (1) haben 1933, auf früheren Arbeiten von *Zuckerkandl* und *Messiner-Klebermass* (2), sowie *Pauly* und *Ludwig* (3) fußend, eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Glucosamin mitgeteilt: Bei Kondensation des Glucosamins mit Acetylaceton zu einem Pyrrolderivat (3-Acetyl-2-methyl-5-tetraoxybutylpyrrol) und nachheriger Behandlung des entstandenen Produktes mit dem Reagens von *Ehrlich* (p-Dimethylaminobenzaldehyd) in stark alkoholischer Lösung tritt eine stabile rötliche Färbung auf. Nach *Elson* und *Morgan* sind bei dieser Methode die Fehler nicht größer als 5%, wofern man in reinen Lösungen von Glucosamin und mit Substanzmengen von 0,5 bis 3,0 mg arbeitet. Die Anwesenheit von verschiedenen Zuckern und Aminosäuren stört nach diesen Autoren die Bestimmung nicht. Chondrosamin gibt die Reaktion in quantitativ gleicher Stärke. *Elson* und *Morgan* haben ihre Methode nicht zur Bestimmung des Glucosamins in Eiweißhydrolysaten verwendet. Dies ist aber von anderer Seite geschehen [*Palmer* und *Meyer* (4), *Dakin* und *West* (5)]. Diese Forscher, die keine Durchprüfung der Methode ausgeführt haben, sind sich darüber klar, daß sie in der von ihnen angewandten Form nur angenäherte Werte ergibt. Kürzlich haben *Boyer* und *Fürth* (6) die Methode einer Überprüfung unterzogen. Nach einigen Abänderungen, deren wesentlichste der Ersatz des Alkohols durch Eisessig war, bekamen sie mit reinem Glucosamin und Substanzmengen von 1 bis 10 mg befriedigende Resultate. Dagegen fielen die Werte bei Zusatz von Glucosamin zu Eiweißhydrolysaten oder zu genügend konzentrierten Aminosäurelösungen viel zu niedrig aus.

Im hiesigen Institut wurde die Methode von *Elson* und *Morgan* zur Bestimmung des Glucosamingehalts in einigen Mucinen und Mukoiden von *Blix* (7) und von *Karlberg* (8) verwendet. Die Methode wurde nach einer Serie von Vorprüfungen mit unbedeutenden Abänderungen verwendet und hat sich dabei gut bewährt. Das Verfahren wird in der genannten Arbeit von *Karlberg* kurz angegeben. Ich habe das Verfahren nochmals und etwas eingehender durchgeprüft. Nach mehreren Versuchsreihen, bei denen unter anderem die Konzentration von Acetyl-

aceton, *Ehrlichs* Reagens und Alkohol, sowie Erwärmungsdauer und -technik variiert wurden, habe ich die folgende Ausführung der Reaktion als am besten geeignet gefunden:

2 ccm der zu prüfenden Lösung, die 0,1 bis 0,3 mg Glucosaminhydrochlorid enthalten sollen, werden mit 2 ccm Acetylacetonlösung[1] versetzt. Das Gemisch wird dann im Wasserbad bei 95° 20 Minuten lang erwärmt[2]. Nach dem vollständigen Abkühlen unter der Wasserleitung werden 20 ccm Alkohol und dann 2 ccm *Ehrlichs* Reagens[3] zugesetzt. Die Farbentwicklung erreicht innerhalb etwa 30 Minuten ihr Maximum und die Farbintensität verändert sich während weiterer 30 Minuten nicht merklich. Ich habe die Ablesung gewöhnlich nach 45 Minuten vorgenommen. Dieses Verfahren schließt sich also nahe an das von *Elson* und *Morgan* angegebene.

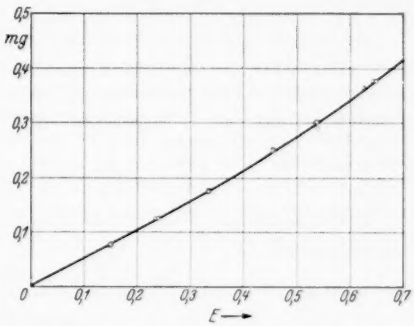


Abb. 1. Jeder Einzelpunkt ist der Mittelwert einer Serie von vier bis sechs Bestimmungen, jeder Doppelpunkt repräsentiert die identischen Mittelwerte zweier solcher Serien.

Die Ablesung wurde im Stufenphotometer (*Zeiss*) unter Anwendung von Filter S 53 vorgenommen. Die Tatsache, daß mit diesem Filter stärkere Lichtabsorptionen gefunden werden als mit den anderen Filtern, entspricht dem Befund, daß die Reaktionslösung eine starke Absorptionsbande im grünen Teil des Spektrums aufweist. In die Vergleichsküvette wird eine ebenso behandelte Probe eingefüllt, bei der aber die 2 ccm *Ehrlichs* Reagens durch 2 ccm einer Mischung aus gleichen Volumina Alkohol und konz. Salzsäure ersetzt sind.

In Abb. 1 sind die erhaltenen Extinktionskoeffizienten als Funktionen der angewandten Mengen Glucosamin-hydrochlorid aufgezeichnet. Wie ersichtlich, besteht eine fast lineare Beziehung bis zu Mengen von 0,3 mg Glucosamin-hydrochlorid. Die Streuung der erhaltenen Werte ist (sowohl absolut als auch prozentuell ausgedrückt) in dem Gebiet zwischen 0,1 bis 0,3 mg am niedrigsten.

[1] 1 ccm Acetylaceton wird in 50 ccm n/2 Sodalösung gelöst. Die Lösung wird kühl aufbewahrt und jeden dritten Tag frisch bereitet. — [2] Um Verdunsten von Flüssigkeit zu vermeiden, wurde das Erhitzen in Röhrchen mit eingeschliffenem Glasstöpsel (ich verwendete Vakuumröhrchen nach *Thunberg*) ausgeführt. Die Röhren wurden in ein Wasserbad, dessen Deckel mit geeigneten Bohrungen versehen war, so eingehängt, daß sie mindestens bis zu ihrer halben Länge in die Heizflüssigkeit eintauchten. Erwärmen auf 95° ist aus praktischen Gründen besser als Erwärmen auf Kochtemperatur des Wassers. Die Temperatur des Heizbades wird bequem mit Kontaktthermometer und Tauchsieder einreguliert. — [3] 0,8 g p-Dimethylamino-benzaldehyd (*Merck*) in 30 ccm 95%igem Alkohol gelöst und mit 30 ccm konz. Salzsäure versetzt.

Bei der Prüfung der Verwendbarkeit der Methode für die Bestimmung von Glucosamin in Proteinstoffen bin ich folgendermaßen vorgegangen.

0,1 g Casein bzw. 2 ccm Blutserum wurden teils mit und teils ohne Zusatz von reinem Glucosamin-hydrochlorid mit 5 ccm n Salzsäure in geschlossenen Kölbchen 3 Stunden lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Der Kolbeninhalt wurde dann in der Winkelzentrifuge 10 Minuten lang zentrifugiert. Die klare Lösung wurde dekantiert, das Hydrolysenkölbchen mit 2 ccm n Salzsäure gewaschen und diese Flüssigkeit zu der Fällung im Zentrifugenglas gegeben. Nach dem Aufwirbeln der Fällung wurde nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde die gleiche Operation wiederholt. Die Waschflüssigkeiten wurden mit dem Hydrolysat vereinigt und mit Wasser auf genau 10 ccm aufgefüllt. — Um richtige Analysenresultate zu erhalten, ist es wesentlich, *die Lösung nun genau zu neutralisieren* (sowohl bei Unter- als auch bei Überneutralisation werden viel zu niedrige Werte erhalten). Es werden deshalb 5 ccm der Versuchslösung mit 4 n Natronlauge unter Verwendung von Methylrot als Indikator genau titriert. Die zur Neutralisation erforderliche Laugenmenge wird zu den verbleibenden 5 ccm der Versuchslösung gegeben. Das Gemisch wird dann mit Wasser auf ein Volumen von 8 ccm gebracht. Davon werden 2 ccm wie oben beschrieben analysiert.

In der nachstehenden Tabelle sind die Resultate der Zusatzversuche wiedergegeben.

Tabelle I.

Nr.	Probe	Zugesetztes Glucosamin-hydrochlorid in mg	Glucosamin-hydrochlorid gefunden in mg	Glucosamin-hydrochlorid berechnet in mg
1	Casein, 0,1 g	0	0,05	—
		0,13	0,18	0,18
		0,26	0,31	0,31
			0,32	
2	Casein, 0,1 g	0	0,04	—
		0,20	0,26	0,24
3′	Blutserum, 2 ccm, Schwein	0	0,19	—
		0,06	0,24	0,25
			0,25	
		0,12	0,33	0,31
4	Blutserum, 2 ccm, Mensch	0	0,18	—
		0,07	0,24	0,25
		0,14	0,32	0,32
5	Blutserum, 2 ccm, Mensch	0	0,18	—
		0,07	0,24	0,25
6	Blutserum, 2 ccm, Kalb	0	0,25	—
		0,07	0,29	0,32
		0,14	0,38	0,39
7	Blutserum, 2 ccm, Kalb	0	0,25	—
		0,07	0,30	0,32
		0,14	0,38	0,39

Wie ersichtlich, werden die zugesetzten Mengen Glucosaminhydrochlorid mit einer Genauigkeit wiedergefunden, die im allgemeinen hin-

reichend sein dürften. Die Hydrolysenzeit von 3 Stunden zeigte sich bei Bluteiweiß, Casein und Eiweiß einer Reihe von parenchymatösen Organen wie Leber, Niere und Milz, sowie von Muskel- und Nervengewebe als hinreichend. Bei mehreren Stunden fortgesetzter Hydrolyse bleiben die Werte unverändert. Demgegenüber erforderten Knorpel, Knochen und Sehnen, sowie isolierte Mucine und Mukoide Hydrolysenzeiten bis zu 12 Stunden, um maximale Extinktionswerte zu liefern.

Über die Spezifität der Reaktion habe ich keine besonderen Versuche angestellt. Jedenfalls habe ich festgestellt, daß Blutfarbstoff und Gallenfarbstoff nach Behandlung wie oben die Reaktion nicht zeigen oder stören. Bereits *Elson* und *Morgan* haben darauf hingewiesen, daß Tryptophan die Reaktion nicht gibt. Ich habe das Verfahren zunächst zur Bestimmung von Glucosamin in Blutserum normaler und erkrankter Individuen angewandt. Über diese Ergebnisse soll in Kürze berichtet werden.

Zusammenfassung.

Die Methode von *Elson* und *Morgan* wurde für die Bestimmung von Glucosamin in Eiweiß weitergebildet und erwies sich dabei als gut verwendbar. Beleganalysen werden mitgeteilt.

Literatur.

1) *Elson* u. *Morgan*, Biochem. J. **27**, 1824, 1933. — 2) *Zuckerkandl* u. *Messiner-Klebermass*, diese Zeitschr. **236**, 19, 1931. — 3) *Pauly* u. *Ludwig*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **121**, 176, 1922. — 4) *Palmer* u. *Meyer*, J. of biol. Chem. **107**, 629, 1934. — 5) *Dakin* u. *West*, ebenda **109**, 489, 1935. — 6) *Boyer* u. *Fürth*, diese Zeitschr. **282**, 242, 1935. — 7) *Blix*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **240**, 43, 1936. — 8) *Karlberg*, ebenda **240**, 55, 1936.

Beitrag zur Mikrostickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

Von

Z. Zakrzewski und **Hans J. Fuchs.**

(Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1935.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

Die gestellte Aufgabe bestand darin, die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Mikrostickstoffbestimmung soweit zu treiben, daß bei verhältnismäßig großen Mengen des zu erwartenden Stickstoffwertes der Fehler derart klein ausfiel, wie er bisher nur bei Verfahren erreicht werden konnte, welche von vornherein mit äußerst geringen Mengen Untersuchungsmaterials arbeiteten. Ungefähr zahlenmäßig ausgedrückt war zu verlangen, daß bei einer Gesamtmenge von etwa 0,8 mg N der Maximalfehler 0,001 mg N betragen durfte.

Dazu war es notwendig, folgende Teilprozesse der Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* zu überprüfen: 1. die feuchte Verbrennung des organischen Materials; 2. die Freisetzung des Ammoniaks aus dem gebildeten Ammoniumsulfat und seine Überführung in die vorgelegte Schwefelsäure bei der Destillation; 3. die jodometrische Titration.

1. Verbrennung der organischen Substanz.

Aus den zahlreichen Verfahren, eine restlose Überführung der N-, NH-, NH_2- und NH_3-Gruppen zu Ammoniumsulfat bei der Verbrennung zu erreichen, ist bereits ersichtlich, daß von keiner derselben dieses Ziel vollständig erreicht werden konnte. Es sei diesbezüglich auf die einschlägige Literatur verwiesen (1). Wir haben versucht, einen Teil dieser Fehler aufzudecken, und sind dabei zu folgenden Ergebnissen gekommen. Die bei der Verbrennung nebeneinander ablaufenden Oxydations- und Reduktionsprozesse geben ein derart verwickeltes Bild, daß bei Verbrennung verschieden konfigurierter Stoffe jedesmal verschiedene Ergebnisse zu erwarten sind. Einzelne Verbindungen (2) sind überhaupt nicht restlos zu zerlegen, selbst wenn die kräftigsten Oxydationsmittel dabei verwendet werden würden. Dieses ist aber für sich wiederum deshalb nicht möglich, da unter ihrer Einwirkung ein Teil des gebildeten Ammoniaks gleichfalls oxydiert werden und damit verloren gehen würde. Weiterhin haben wir festgestellt, daß bei Verbrennung von Aminosäuren ein Teil der Amine in flüchtiger Form den Kolben verläßt und somit der Bestimmung entgeht. Bei der Verbrennung von Glykokoll entsteht z. B. im Augenblick des Auftretens

weißer Dämpfe im Kolben Methylamin, welches zusammen mit den Dämpfen den Kolben verläßt und — aufgefangen — sich nachweisen läßt. Auch die größten Vorsichtsmaßregeln, wie äußerst vorsichtiges Erwärmen u. a., können diesen Verlust nicht vollständig verhindern. Durch Zusatz verschiedener Oxydationsmittel wird zwar der Aufschluß der organischen Substanz mehr oder weniger beschleunigt, andererseits erhebt sich die Gefahr, daß ein Teil des Ammoniaks gleichfalls oxydiert wird. Das gleiche ist bei Zusatz von verschiedenen Katalysatoren der Fall. Der beste Weg ist — wie Versuche gezeigt haben — immer noch der der sehr langen Verbrennung. Bei dieser wird — wie empirisch ermittelt werden kann — nach einer bestimmten Zeit der „vollständige" Aufschluß erreicht (wobei es auch dann noch immer Substanzen gibt,

Abb. 1.

die nicht zum restlosen Aufschluß gelangen!), d. h. nach weiterer Erhitzung ist keine Zunahme an Ammoniumsulfat mehr zu erreichen. Gleichzeitig hat sich dabei erwiesen, daß die Verluste von dabei gebildetem Ammoniak die minimalsten sind. Setzt man ein Oxydationsmittel zu der Schwefelsäure zu, das mengenmäßig so bemessen ist, daß es zum Aufschluß der organischen Substanzen gerade noch nicht ausreicht, so wird damit die Gefahr des Ammoniakverlustes soweit verringert, daß sie unterhalb der oben genannten Fehlergrenze liegt. Andererseits wird die Aufschließung des Materials erleichtert und beschleunigt. *Aus all diesem ergibt sich, daß die Verbrennung bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ein Kompromiß sein muß, dessen Einzelheiten man entsprechend der Menge und Beschaffenheit der zu untersuchenden Substanz variieren muß.* Der für uns speziell in Frage kommende Zweck der hier dargelegten Methode ist der der Reststickstoffbestimmung im menschlichen Blutserum, und die hier angegebenen Daten sollen diesem Zweck allein entsprechen.

Zur Bestimmung des Reststickstoffs wird genau 1,0 ccm des zu untersuchenden klaren Blutserums in ein Reagensröhrchen einpipettiert. Dazu dient eine Präzisionspipette von besonderer Form (Abb. 1). Bei dieser ist die konische Auslaufspitze derart umgeändert, daß an das senkrecht herabführende, in seiner Weite unverändert gehaltene Rohr geradlinig eine Kapillare angeschmolzen ist, wobei darauf geachtet wurde, daß der Übergang des weiten zum kapillaren Lumen im fast rechtwinkligen Knick erfolgt. Läßt man in einer solchen Pipette das Serum ablaufen, so kann man beobachten, daß die Flüssigkeitssäule am Beginn der Kapillare ruckartig abreißt, wenn man vorher das Kapillarende an die Wand des Reagensglases anlegt. Zwecks Erleichterung der oberen genauen Meniskuseinstellung ist das mit dem Finger zu verschließende Pipettenende konisch ausgezogen und am Ende, welches ein Loch von etwa 1 mm Durchmesser aufweist, glattgeschliffen.

Das zu untersuchende, klar zentrifugierte Serum wird in der Pipette zweimal bis kurz über die Ringmarke hochgesaugt und wieder auslaufen gelassen, wobei man sich überzeugt, daß keine Luftblasen an der Pipetteninnenwand hängen bleiben. Danach wird das Serum erneut hochgesaugt und der obere Flüssigkeitsmeniskus so eingestellt, daß sein tiefster Punkt die Ringmarke gerade zu berühren beginnt. Mittels eines sauberen, faserfreien Filterpapieres wird die gesamte benetzte Außenfläche der Pipette abgetrocknet, wobei sorgfältig darauf zu achten ist, daß das Papier nicht mit der dünnen Flüssigkeitssäule in der Kapillare in Berührung tritt. Dabei hilft schräge Haltung der Pipette, wodurch die Flüssigkeit in ihr ein wenig emporsteigt. Nach Abwischen wird sie wieder senkrecht gehalten, und beide Enden der Flüssigkeitssäule werden nochmals auf ihren genauen Stand kontrolliert. Dann wird die Pipettenspitze tief in das Reagensglas hinabgeführt und an die Seitenwand desselben etwa 2 cm über dem Boden angelegt. Man läßt die Flüssigkeit ablaufen, wartet etwa 5 Sekunden nach Abreißen der Flüssigkeitssäule am Anfang der Kapillare, hebt dann das Pipettenende von der Glaswand ab, legt es etwa 1 cm darüber wieder an diese an und streicht dann das Kapillarende in zickzackförmiger Bewegung nach aufwärts unter gleichzeitiger Drehung der Pipette um ihre Längsachse an der Innenwand des Reagensglases vollständig ab: nachträgliches Abwischen der Kapillaraußenwand mit Filtrierpapier darf keine Spur von Flüssigkeit auf das Papier bringen. Die erwähnte Wartezeit von etwa 5 Sekunden muß bestens konstant gehalten werden, um den Nachlauf der Flüssigkeit in der Pipette gleichmäßig zu halten.

Wiegt man mehrere derartig abpipettierte gleiche Mengen des gleichen Serums unter Verwendung der gleichen Pipette auf einer guten analytischen Waage nach, so zeigt sich, daß bei genauer Einhaltung der beschriebenen Bedingungen eine Genauigkeit bis zu 0,2 mg erhalten werden kann. Nehmen wir das Durchschnittsgewicht von 1,0 ccm Serum mit 1,01 g an, so beträgt der Pipettierfehler bei 1,0 mg 0,099 %, bei 0,2 mg 0,0198 %, liegt also unter 0,1 %. Die erstere Genauigkeit ist Vorbedingung, um bei Durchführung der gesamten Analyse eine Fehlergrenze von 0,1 % erhalten zu können.

Dementsprechend ist die Menge der zu Enteiweißung verwendeten 5,0 %igen Trichloressigsäure auf 11,0 ccm bemessen, um bei dieser Pipettierung ebenso wie bei der nachfolgenden Überführung von 9,0 ccm klaren Filtrats in den Verbrennungskolben durch die großen Flüssigkeitsmengen geringe Pipettierfehlerprozente zu erreichen. Der beim Zulaufenlassen der Trichloressigsäure auftretende Eiweißniederschlag wird durch kräftiges Schütteln mit der Flüssigkeit homogenisiert, indem man das Glas mit dem mit gesäubertem Gummifinger bekleideten Daumen verschließt. Nach 15 Minuten Stehenlassen wird der Inhalt des Röhrchens, in dem sich der Niederschlag bereits abgesetzt hat, nochmals in gleicher Weise kräftig geschüttelt und dann durch ein Filter von *Schleicher & Schüll* („gehärtet" 575, 9 cm Durchmesser) klar filtriert [1]. Das Papierfilter wird in besonderer Weise gefaltet: Zuerst wird das

[1] Untersuchungen anderer Filtersorten von *Schleicher & Schüll* haben u. a. gezeigt, daß Blaubandfilter zur Stickstoffbestimmung insofern unbrauchbar sind, als sie Verunreinigungen enthalten, welche auf einfachste Weise durch Befeuchten dieser Filter mit *Nessler*-Lösung festzustellen sind: die vorerwähnte Filtersorte zeigt dabei keine Spur von Gelbfärbung, die Blaubandfilter weisen dunkelgelbe Flecken vor. Da diese bei allen untersuchten Proben auftraten, muß ihre Entstehung der Herstellungs- bzw.

Filter einfach zusammengelegt, wobei die Knicklinie nicht durch den Filtermittelpunkt, sondern 2 bis 3 mm seitlich davon läuft, so daß der obenliegende runde Filterrand um das gleiche Maß gegen den untenliegenden zurücksteht. Dann wird das Papier nochmals im rechten Winkel dazu geknickt, wobei diesmal die Knicklinie durch den Mittelpunkt der ersten geht. Bringt man dann das Filter in den besonders geformten Trichter (Abb. 2), der es im trockenen Zustande entfaltet festhält und weiterhin erlaubt, beim Filtrieren selbst den Filterinhalt mittels eines Uhrglases gegen die Laboratoriumsluft abzuschließen, ohne daß dieses das Papier berührt, so reicht der geknickte Innenrand des Papiers nicht bis an die obere Kante des außenliegenden Papiers empor (Abb. 3). Damit wird sicher verhütet, daß die zwischen den beiden Papierschichten emporsteigende zu filtrierende Flüssigkeit den Filterrand übersteigt und somit auf dem Wege zwischen Glas und Papier in das Filtrat selbst gelangt.

Abb. 2.

Abb. 3.

Die Finger müssen beim Falten des Filters und Einsetzen desselben in den Trichter peinlich sauber und trocken sein, da sie andernfalls stickstoffhaltige Substanzen abgeben. Bei Aufbrechen eines neuen Paketes von Filtern muß das obere und untere Blatt mit *Nesslers* Reagens auf Ammoniumfreiheit geprüft und bei geringster Gelbfärbung das Paket verworfen werden. Außerdem sind die Filter in dichtschließendem, sauberem Gefäß aufzubewahren.

Beim Aufbringen der Flüssigkeit auf das Filter muß sorgfältig das Herumspritzen von Flüssigkeit verhütet werden. Der Trichter wird danach mit einem passenden Uhrglas verschlossen, wodurch Zutritt von Staub oder Ammoniak sowie Verdampfen von Wasser während der Filtration vermieden wird. Nach Durchlauf der ersten Tropfen des Filtrats überzeugt man sich von ihrer Wasserklarheit. Nicht vollkommen klare Filtrate müssen nochmals durch das gleiche Filter filtriert werden. Nach Durchgang sämtlicher Flüssigkeit durch das Filter werden 9,0 ccm des wasserklaren Filtrats der feuchten Veraschung zugeführt.

Da die in der zu filtrierenden Flüssigkeit enthaltenen Stoffe einen fließenden Übergang von hochmolekularen Kolloiden bis zu Aminosäuren darstellen, sind auch Teilchen enthalten, deren Durchgang durch das Filter von der Dichte desselben stark abhängig ist. Da diese im Verlauf der Filtration anwächst, indem der auf dem Papier befindliche Niederschlag die Poren des Papiers verstopft, ist es klar, daß sich im ersten Filtrat mehr Stickstoff nachweisen läßt als im letzten. Unter diesen Verhältnissen ist es verständlich, daß folgende Punkte bei der Filtration beachtet werden müssen: 1. Bei Parallelbestimmungen muß die Filtration in allen Röhrchen möglichst gleich schnell vonstatten gehen; 2. die auf die Filter gebrachten Flüssigkeitsmengen müssen möglichst gleich groß sein; 3. es muß solange mit weiterer Arbeit gewartet werden, bis die Filtration vollkommen beendigt ist; 4. vor Überführung einer bestimmten Menge des Filtrats in den Verbrennungskolben muß das Filtrat homogenisiert werden; 5. sollten sich unter den Filtern solche befinden, deren Papier bezüglich Dicke von den anderen fühlbar abweicht, so sind sie zu verwerfen.

Reinigungsmethode der Blaubandfilter zuzuschreiben sein. Die in ihnen enthaltene, *Nessler*-Farbstoff gebende Verunreinigung kann aus den Filtern mit Wasser extrahiert werden.

Die zur Verbrennung sowie dieser folgenden Destillation verwendeten Kolben fassen etwa 50 ccm und bestehen aus einem birnenförmigen Körper aus Duran- oder Pyrexglas, der sich in allmählichem Übergang in den schlanken Hals aus Geräteglas 20 von 6 mm innerem Durchmesser fortsetzt und mit einem Normalschliff endigt. Seine Gesamtlänge beträgt 170 mm (Abb. 4). Die hier gewählte Glassorte hat sich als die brauchbarste erwiesen. In die Kolben werden je zwei bis drei kleine Quarzsplitter sowie drei Glaskügelchen gebracht: die ersteren werden aus ausgeglühtem Quarz hergestellt; die letzteren werden nach Einkauf mehrmals gewaschen, dann mit konzentrierter Schwefelsäure einige Stunden unter dem Abzug im Jenaer Kolben gekocht, dann mit destilliertem Wasser schwefelsäurefrei gewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Sie werden in eingeschliffener Flasche aufbewahrt. Diese verhüten sicher etwaiges Stoßen bei der Verbrennung und Destillation. Auf Grund einer sehr großen Erfahrung, die mittels einer anderen Reststickstoffbestimmungsmethode (3) erlangt worden ist, erfolgt die Verbrennung des Reststickstoffiltrats des Blutserums mit folgendem Gemisch: 7,5 g = 8 ccm 20%iger $HClO_4$ werden mit Aqua bidest. auf 500,0 ccm aufgefüllt, zu welcher Menge 500,0 ccm reinster Schwefelsäure (*Merck*, pro analysi, für forensische Zwecke) unter Kühlung langsam zugegossen werden. Das Gesamtvolumen der Mischung beträgt nach Abkühlung auf Zimmertemperatur 950 ccm. 1,0 ccm dieses Gemisches (enthält 1,26 mg $HClO_4$ und 0,97 g H_2SO_4) wird zur Veraschung verwendet.

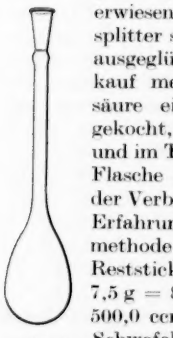


Abb. 4.

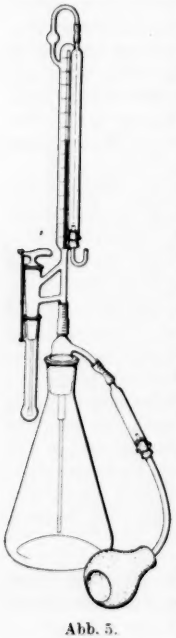


Abb. 5.

Die so zubereitete Flüssigkeit wird in eine besondere Bürette eingefüllt (Abb. 5). Bei dieser wird sie gegen Eindringen von Verunreinigungen durch zwei lange mit Phosphorsäure getränkte Glaswollefilter geschützt. Ihr Auslaufhahn ist besonders lang gehalten und mittels Glaskappe geschützt. Nach Fortnahme derselben kurz vor Gebrauch schiebt man den Kolbenhals über den langen Auslaufhahn, so daß sein Ende in den freien Kolbenraum ragt, und läßt dann 1,0 ccm aus dem vorher mit automatischem Rücklauf bis zum Nullpunkt gefüllten Bürettenrohr einlaufen. Darauf bringt man mittels Präzisionspipette 9,0 ccm des homogenisierten Filtrats in den Kolben, verschließt diesen mit einem leicht angefeuchteten Schliffhaken und setzt ihn am Verbrennungsgestell an, dessen Verbrennungsrohr vorher mit ammoniakfreiem Wasser gründlich ausgespült wurde. Diese bereits in einer früheren Arbeit (4) beschriebene Apparatur wurde inzwischen in einigen Punkten verbessert, auf die der Kürze halber hier nicht näher eingegangen wird.

Bei der nunmehr folgenden Verbrennung ist darauf zu achten, daß die Erhitzung aller Kolben gleichmäßig geschieht. Daher muß darauf gesehen werden, daß diese gut in dem kleinen Sandbad auf den Mikroträgern liegen, und daß die Flammen der darunter befindlichen Mikrobrenner konstant sind. Zu diesem Zwecke ist in die Gasleitung vom Laboratoriumstisch zum Verbrennungs-

gestell ein mit zwei Marken versehener Gasdruckmesser (Abb. 6) eingeschaltet. Zuerst wird die Wasserstrahlpumpe, die die Luft durch die Gaswaschflasche, das Verbrennungsrohr sowie Rückschlagventil saugt, in mäßigen Gang gesetzt; dann werden die Mikrobrenner angezündet und der Gasdruck so geregelt, daß die Flüssigkeit im Gasdruckmesser etwas unterhalb der Mitte des Raumes zwischen beiden Marken steht. Nachdem die Flüssigkeit in allen Kolben großblasig siedet, wird der Gasdruck verstärkt, so daß im Gasdruckmesser die obere Marke erreicht wird.

Im allgemeinen beginnen nach etwa 15 Minuten in den Kolben graue Dämpfe zu entstehen, nach kurzer Zeit wird die anfangs braune Flüssigkeit farblos und nach weiteren 20 Minuten dürfte meistens die Verbrennung als beendigt anzusehen sein. Es ist nicht möglich, eine konstante Verbrennungszeit für alle Fälle anzugeben, da diese mit dem Gehalt der Filtrate an zu zerstörenden Substanzen wechselt.

Nach Abschluß des Verbrennungsprozesses wird das Gas abgedreht, nach weiteren 1 bis 2 Minuten die Wasserstrahlpumpe voll aufgedreht, dann werden besonders herausstehende Haken in das Verbrennungsrohr gedrückt, die Gaswaschflasche nach oben gedreht, wonach die in ihr vorhandene verdünnte Schwefelsäure das Verbrennungsrohr durchläuft. Danach wird auf gleiche Weise das Rohr noch zweimal mit reichlichen Mengen ammoniakfreiem Wasser durchspült, die Gaswaschflasche erneut mit verdünnter Schwefelsäure dreiviertel vollgefüllt und mittels leichten Kippens die Glaswolle in ihr mit dieser Flüssigkeit gründlich durchtränkt. Während noch immer ohne Unterbrechung die Wasserstrahlpumpe weiterläuft, bleiben die Kolben zwecks Abkühlung an dem Verbrennungsrohr. Erst kurz vor Abnahme zwecks Ansatz am Destillationsgestell wird der Durchzug abgestellt.

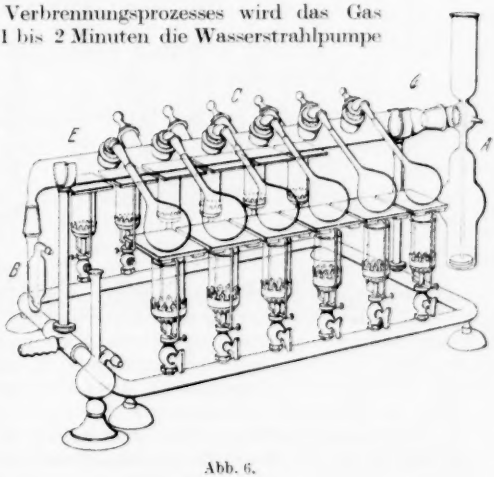


Abb. 6.

2. Destillation.

Bereits früher hatte sich der eine von uns (5) damit befaßt, die von *Bang* angegebene Mikro-*Kjeldahl*-Apparatur in einigen Punkten zu verbessern. Durch Einführung von normalisierten Schliffen an den Hälsen der Verbrennungskolben sowie der entsprechenden Gegenschliffe an den Destillationsapparaten, durch Ausbildung der letzteren aus einem zusammenhängenden Stück aus Jenaer Geräteglas und entsprechende Konstruktion des vier Stück von diesen tragenden Metallgestelles war es möglich geworden, trotz wesentlich vereinfachter Handhabung gleichzeitig vier Destillationen ohne Schwierigkeiten durchzuführen.

Das neue Destillationsgestell (Abb. 7) enthält *auf noch geringerem Raum sechs* Destillationsapparate, bei denen weitere Verbesserungen vorhanden sind. Sämtliche sechs Kühler sind parallel geschaltet, wobei ein sichtbarer Wasserdruckmesser garantiert, daß alle vom Kühlwasser gleichmäßig durchlaufen werden. Die Brenner sind durch Glimmerzylinder geschützte und mit Sparflamme und Hahn versehene Mikrobrenner, die mittels eines Gasdruckmessers — wie beim Verbrennungsgestell beschrieben — kontrolliert werden. Jedes Destillationsrohr beginnt mit einem Nutschliff, der — normalisiert — gasdichten Ansatz des Verbrennungskolbens

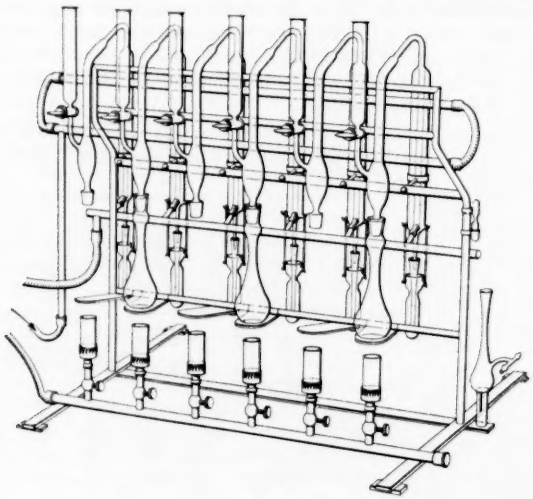


Abb. 7.

zur Destillation verbürgt. Über dem Schliff liegt eine *Hopkins*-Kugel, in die der Zulauf für Natronlauge eingeschmolzen ist. Das Zulaufrohr setzt sich nach oben in den Glashahn und das darüber befindliche Vorratsgefäß für 4 ccm NaOH fort. Die *Hopkins*-Kugel geht in ein etwa 8 cm langes, weiteres Rohr über, welches eine zweite *Hopkins*-Kugel trägt. Von dieser führt ein glattes, später verengtes Rohr schräg aufsteigend zu dem senkrecht stehenden, 20 cm langen Kühler, in dessen unterem Ende das dünne Kühlrohr zur Kapillare verengt ist. Das aus dem Kühlmantel austretende Ablaufrohr ist am unteren, freien Ende zur langen Kapillare ausgezogen, deren Abschluß schräg abgeschliffen ist. Die Destillationskolben werden durch federnde Träger an die Nutschliffe angepreßt. Bei Nichtgebrauch der Apparatur werden beide freien Enden jedes Destillationsstückes durch Glaskappen luftdicht verschlossen, so daß Ausdämpfen vor nächster Verwendung sich erübrigt. Die Vorlagen (Abb. 8) haben eine Form, die bei der später beschriebenen jodometrischen Titration den Durchblick durch wenig Flüssigkeit in tiefer Schicht und damit die Erkennung von geringen Farbspuren ermöglicht. Ihre eiförmige obere Erweiterung erlaubt es, auch mit größeren Flüssigkeitsmengen in besonderen Fällen zu

Abb. 8.

arbeiten. Bei der Destillation hängen diese Vorlagen in einem Gestell, das es erlaubt, sie gemeinsam mit einem Handgriff in verschiedenen Höhen festzuhalten, so daß ihr Emporheben oder Senken vor, während und nach der Destillation gemeinsam erfolgt.

Die zur Destillation notwendigen Reagenzien sind 1. bidestilliertes Wasser, 2. 28%ige NaOH (ex rotulis pur. pro analys. *Merck*), hergestellt durch Zusammenbringen von 28 g und 72 ccm bidestillierten Wassers; 3. n/200 reinste Schwefelsäure mit 1%igem KJO_3 in bidestilliertem Wasser.

Eingehende Untersuchungen über die zur Durchführung der Destillation notwendigen Reinheit des destillierten Wassers haben gezeigt, daß der

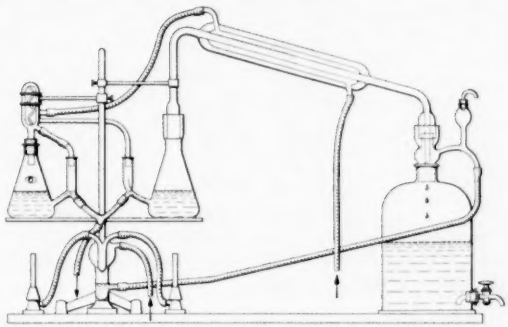


Abb. 9.

Gebrauch von unter besonderen Reinheitsvorsichtsmaßregeln zweimal destilliertem Wasser unerläßlich ist. Die dazu gebaute Apparatur (Abb. 9) ist gleichfalls die Verbesserung einer früheren (6). Bei dieser wird im ersten Kolben über alkalisches Kaliumpermanganat in den zweiten Kolben und aus diesem über Phosphorsäure erneut in die Vorratsflasche destilliert. Alle Teile der zweiten Destillation sowie die Vorratsflasche bestehen aus Jenaer Glas und sind ohne Gummi gasdicht miteinander verbunden.

Aus diesem Wasser wird die Natronlauge hergestellt: 28 g NaOH in rotulis werden in 72 ccm bidestilliertem Wasser gelöst. Im Gegensatz zu anderen Angaben (7) erzeugt Natronlauge nach unseren Erfahrungen bei der Destillation weniger Schaumbildung als Kalilauge. Zur Herstellung der n/200 Schwefelsäure muß ebenfalls dieses reine Wasser verwendet werden; die Meßkolben müssen aus Jenaer Glas bestehen. In die etwa 0,5 ccm Flüssigkeit enthaltenden Verbrennungskolben werden nach Abschluß der Verbrennung 15 ccm bidestillierten Wassers und etwas Talkum eingefüllt, die dabei frei werdende schweflige Säure wird ausgeblasen. Der Nutschliff des Destillationsrohres, an den der Kolben angesetzt werden soll, wird in gesättigte, reinste Natronlauge eingetaucht und dann sofort der Kolbenschliff darüber geschoben. Die im Nutring befindliche starke Lauge dichtet die Schliffbindung und verhütet gleichzeitig, daß Ammoniak bei der Destillation in die Schliffe dringt und damit verloren geht. In die sorgfältig ausgewaschene und schließlich mit bidestilliertem Wasser nachgespülte Vorlage werden mittels einer „Norma-Präcis"-Pipette 5,0 ccm der n/200 Schwefelsäure eingefüllt. Darauf wird die Vorlage in das Haltegestell eingehängt und in diesem bis zum Anschlag emporgehoben, so daß das Kapillarausflußrohr in die Vorlageflüssigkeit eintaucht. Dann werden 4 ccm der 28%igen NaOH

in das Vorratsgefäß des Destillationsstückes eingefüllt, wobei zur Abmessung dieser Menge eine besondere Meßflasche (Abb. 10) benutzt wird. Durch Öffnen des Zulaufhahnes wird die Natronlauge in den Destillationskolben gebracht; dann werden Kühlwasser und Gas eingeschaltet; zur Regulierung des letzteren dient der vorher erwähnte Gasdruckmesser mit Marke.

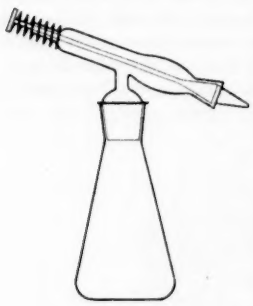


Abb. 10.

Sobald die ersten Destillatmengen im Kühler sichtbar werden, wird die am Destillationsgestell befindliche Sanduhr eingeschaltet. Nach 3 Minuten wird die Vorlage soweit gesenkt, daß das Ende des Ausflußrohres über der engsten Stelle der Vorlage steht. Die Flamme wird ausgedreht, wenn in der Vorlage die 20 ccm-Ringmarke erreicht wurde, und der Kolben vom Nutschliff abgenommen. Sollte er dabei besonders festsitzen, so lockert ein leichter Schlag gegen den Kolbenrand mühelos die Verbindung. Die Vorlage wird im Gestell bis zum Anschlag gesenkt und fortgenommen. Sollten im Kühler noch ausnahmsweise größere Flüssigkeitsmengen stehen, so können sie mittels eines am Nutschliff anzusetzenden Gummiballes in die Vorlage vor Abnahme derselben gedrückt werden.

3. Die jodometrische Titration.

Zum Zwecke der Erhöhung der Titrationsgenauigkeit sind auch hier einige Verbesserungen getroffen worden.

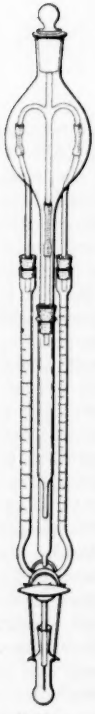


Abb. 11.

Die neue Makro-Mikrobürette (Abb. 11), die gleichfalls in wesentlicher Verbesserung aus einer früheren Konstruktion (6) hervorgegangen ist, besteht aus einem einzigen Hahn, an dem nach unten der Auslauf angesetzt ist, nach oben zwei in einer Ebene stehende Bürettenrohre und das in einer zweiten Ebene stehende zum Vorratsgefäß führende Zulaufrohr. Das linke Bürettenrohr (Makrorohr) faßt 10 ccm und ist in Zehntel ccm geteilt; der Abstand zwischen zwei Teilstrichen beträgt reichlich 2 mm, so daß der Flüssigkeitsmeniskus pro 0,01 ccm um 0,2 mm sich verschiebt. Da das Bürettenrohr einen tiefblauen, schmalen Schellbachstreifen auf weißem Hintergrunde trägt, der im Meniskus eine dunkle, sehr feine und langgestreckte Spitze erscheinen läßt, da die Teilung auf dem Rohr sehr fein und in roter Farbe gehalten ist, kann man die Spitze mit Genauigkeit von $^1/_{100}$ ccm *auf einen Teilstrich einstellen*. Das rechte Bürettenrohr (Mikrorohr) faßt 1,0 ccm und ist in Hundertstel ccm unterteilt. Auch hier ist der Abstand zwischen zwei Teilstrichen etwa 2 mm; beide Bürettenrohre sind oben mit Gummistopfen verschlossen, die durchbohrt sind. Von diesen Bohrungen aus gehen zwei Glasrohre nach oben und sind dort mit einem dritten luftdicht verbunden, welches von unten her nach dem obersten Halsteil des Vorratsgefäßes führt, das darüber mit eingeschliffenem Stopfen verschlossen ist. Dieses Rohr setzt sich nach unten in ein etwa 20 cm langes, mit Glaswolle, Natronkalk und Kaliumhydroxyd in rotulis angefülltes Schutzrohr fort, dessen

unteres Ende wiederum mit durchbohrtem Stopfen verschlossen ist. Dieses Rohr liegt zwischen den beiden Bürettenrohren. Das Vorratsgefäß wird von oben nach Entfernen des eingeschliffenen Stopfens mit n/500 Natriumthiosulfatlösung gefüllt und dann sofort mit dem eingeschliffenen Stopfen verschlossen. Sämtliche von nun ab in das Vorratsgefäß oder die Bürettenrohre eintretende Luft muß das lange Schutzrohr passieren, in dem die Kohlensäure ebenso wie Feuchtigkeit mit Sicherheit zurückgehalten werden. Der unter dem Hahn liegende Auslauf endet in einer eingeschmolzenen Metallhohlnadel. Ihr freies Ende ist schräg abgeschliffen. Da die austretende Flüssigkeit an der Außenwand dieser Nadel nicht hochsteigt, umfaßt ein Tropfen etwa $^1/_{100}$ ccm. Die Bohrungen des Hahnkükens sind derart angeordnet, daß es möglich ist, sowohl beide Bürettenrohre einzeln zu füllen als auch aus jedem der beiden getrennt Flüssigkeit aus der Nadel treten zu lassen. Zwei Klammern halten die Bürette am Vorratsgefäßverbindungsrohr auf einem Stativ, dessen Grundplatte aus weißem Alabaster besteht. Hinter der Bürette ist eine starke Opalglasglühlampe in einem Gehäuse angebracht, deren Licht durch eine blaue Glasplatte (Daylite, Corning) auf die Grundplatte fällt, wenn die Lampe unter Strom gesetzt wird. Diese Glassorte, die uns Herr Dr. *C. G. L. Wolf*, Cambridge, dem wir für seine Liebenswürdigkeit unseren besten Dank aussprechen, besorgte, gibt mit der genannten Glühlampe ein dem Tageslicht derart angenähertes Licht, daß damit jodometrische Titration genau so gut möglich ist wie bei diffusem Tageslicht. Zum Einfetten des Hahnkükens hat sich Ramsayfett als zufriedenstellend erwiesen, wenn es in hauchdünner Schicht aufgetragen wird. Es haftet am Schliff derart fest, daß das Hahnküken noch nach vielen Wochen weich läuft, während alle anderen ausprobierten Fettsorten bald fortgewaschen werden. Das Auslaufrohr wird bei Nichtgebrauch der Bürette mit einer angeschliffenen Glashülse gegen die Außenluft verschlossen.

Diese Bürette erlaubt genaue Titration im Ausmaße von 11,0 ccm bei einmaliger Füllung beider Rohre mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 ccm. Der Meßfehler beträgt also weniger als 0,1 %.

Die n/500 Natriumthiosulfatlösung wird aus einer genauen n/10 Stammlösung, die aus reinstem Salz und bidestilliertem Wasser hergestellt ist, durch Einpipettieren von 20,0 ccm derselben mit einer „Norma-Präcis"-Pipette in den ausgedämpften Meßkolben aus Geräteglas von 1000,0 ccm hergestellt, der dann dreiviertel voll mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt wird. Dann werden 10 ccm Aceton pro analys. *Merck* zugefügt und der gut durchmischte Inhalt mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke des sehr engen, kurzen Halses genau aufgefüllt. Dieser Acetonzusatz erhält die Lösung über Wochen hinaus unverändert. Die Stärkelösung wird aus „löslicher Stärke nach *Zulkowsky*" zu 5 % hergestellt. Auch sie erhält einen Acetonzusatz von 1 %, der sie über lange Zeit konserviert.

Die der Vorlageflüssigkeit nach Beendigung der Destillation zuzusetzende Kaliumjodidlösung weicht gleichfalls von der bisher üblichen ab. 5,0 g KJ pro analys. *Merck, neutral*, werden zu 20,0 ccm Aceton gesetzt und durch längeres Schütteln im verschlossenen Gefäß weitgehend gelöst. Darauf werden 30,0 ccm bidestilliertes Wasser zugefügt, wodurch es leicht zur vollständigen Auflösung kommt. Danach werden 100,0 ccm Methanol pro analys. *Merck* zugesetzt und die Mischung kräftig geschüttelt; wohlverschlossen aufbewahrt ist die Lösung nach 24 Stunden gebrauchsfertig und hält sich mindestens 14 Tage lang praktisch unverändert, im Gegensatz zu

wässerigen KJ-Lösungen, die täglich frisch angesetzt werden mußten. Weiterhin hat diese Lösung folgende Vorzüge: Während sonst nach mehreren Minuten nach Abschluß der jodometrischen Titration erneut freies Jod in der Flüssigkeit erscheint, ist hier das dadurch entstehende „Nachbläuen" aufgehoben. Alle anderen bei der jodometrischen Titration ablaufenden Reaktionen werden nicht gestört. Zur Titration werden von dieser Lösung 3,0 ccm zu der etwa 15 ccm Flüssigkeit enthaltenden Vorlage nach Abschluß der Destillation zugesetzt und mit dem zur Vorlage gehörigen sauberen Rührstab gut homogenisiert. Danach wird die Vorlage mittels Glaskappe verschlossen, wobei der Rührstab in der Vorlage bleibt. Nach wenigstens 15 Minuten Stehenlassen werden 3 Tropfen der Stärkelösung zugefügt, und dann beginnt die Titration, die bis zur Farblosigkeit geführt wird, wobei am Ende der Vergleich der Vorlage mit einer anderen, mit Wasser gefüllten oder fertigtitrierten das Erkennen des Endpunktes wesentlich erleichtert. Da man dabei die Längsschicht der ziemlich hohen Flüssigkeitssäule durchblickt, ist die Empfindlichkeit sehr groß.

Beleganalysen.

Tabelle I. Leertitration.

Vorlage je 5,0 ccm n/400 H_2SO_4, 1 % KJO_3 mit n/500 $Na_2S_2O_3$ titriert; Zusatz von je 3,0 ccm KJ-Lösung.

a)	6,08 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$	*KJ-Lösung*:	2,5 g KJ
	6,09 „		20,0 ccm Aceton
	6,07 „		30,0 „ Aqua bidest.
			100,0 „ Methanol
b)	6,25 ccm	*KJ-Lösung*:	5,0 g KJ
	6,26 „		20,0 ccm Aceton
	6,26 „		30,0 „ Aqua bidest.
			100,0 „ Methanol
c)	6,245 ccm	*KJ-Lösung*:	5,0 g KJ
	6,245 „		15,0 ccm Aceton
	6,24 „		35,0 „ Aqua bidest.
			100,0 „ Methanol

Tabelle II. Leertitration.

Vorlage je 5,0 ccm n/400 H_2SO_4—1 % KJO_3, mit n/500 $Na_2S_2O_3$ titriert; Zusatz von je 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I; ccm n/500 $Na_2S_2O_3$:

22. VIII.:	6,20	6,20	6,21	30. VIII.:	6,26	6,25	6,25
24. VIII.:	6,23	6,22	6,24	3. IX.:	6,21	6,21	6,19
28. VIII.:	6,22	6,23	6,22	6. IX.:	6,20	6,21	6,20

Tabelle III. Leertitration mit Zusatz verschiedener Mengen verschiedener Wassersorten.

Vorlage je 5,0 ccm n/400 H_2SO_4—1 % KJO_3; Zusatz von je 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I.

Leitungswasser. Leertitration mit Zusatz von 15,0 ccm Aqua bidest.: 6,23, 6,23, 6,24 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;

mit Zusatz von 5,0 ccm Leitungswasser: 1,18, 1,17, 1,19 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Aqua monodestillata. Leertitration mit 15,0 ccm Aqua bidest.:
6,23 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;
Zusatz von 15 ccm Aqua monodest.:
6,27, 6,26, 6,27 ccm;
Zusatz von 10 ccm Aqua monodest.:
6,25, 6,25, 6,24 ccm;
Zusatz von 5 ccm Aqua monodest.:
6,23, 6,24, 6,23 ccm.

Aqua bidestillata. Leertitration mit 15,0 ccm Aqua bidest.:
6,23, 6,24, 6,23 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;
Zusatz von 10,0 ccm Aqua bidest.:
6,24, 6,23 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;
Zusatz von 5,0 ccm Aqua bidest.:
6,225, 6,23 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Tabelle IV. Destillation von je 20 ccm Leitungswasser, Aqua monodest. und Aqua bidest.

a) neutral, b) alkalisiert (4,0 ccm 28 %ige NaOH ex rotulis purum pro analys. *Merck*) in die Vorlage, die 5,0 ccm n/500 H_2SO_4—1 % KJO_3 enthält; Zusatz von je 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I.

Leitungswasser:	a) neutral:	8,585, 8,57, 8,53 ccm	n/500 $Na_2S_2O_3$
	b) alkalisiert:	6,10, 6,10, 6,07 „	n/500 $Na_2S_2O_3$
Aqua monodest.:	a) neutral:	6,30, 6,31, 6,30 „	n/500 $Na_2S_2O_3$
	b) alkalisiert:	6,13, 6,13, 6,13 „	n/500 $Na_2S_2O_3$
Aqua bidest.:	a) neutral:	6,22, 6,23, 6,23 „	n/500 $Na_2S_2O_3$
	b) alkalisiert:	6,16, 6,17, 6,16 „	n/500 $Na_2S_2O_3$

Tabelle V.

Leertitration. Zusatz von 15,0 ccm Aqua bidest. in die Vorlage, die 10,0 ccm n/1000 H_2SO_4—1 % KJO_3 enthält. Zusatz von 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I. 5,01, 5,015 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Destillation des Aqua bidest. alkalisiert (20 ccm Aqua bidest. + 4,0 ccm 28 % NaOH). 4,93, 4,94 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Destillation des gleichen Wassers, welches vorher mit Lauge auf halbes Volumen eingedampft worden war, unter genau den gleichen Bedingungen. 4,97, 4,98 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Tabelle VI.

Destillation von Aqua bidest. mit verschiedenen Laugenmengen; Vorlage 5,0 ccm n/400 H_2SO_4—1 % KJO_3; Zusatz von 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I.

30 ccm Aqua bidest. + 0,5 ccm 28 % NaOH 30 „ „ „ + 1,0 „ 28 % NaOH 30 „ „ „ + 4,0 „ 28 % NaOH	6,16, 6,15, 6,16 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$

Destillation von Aqua bidest. (30 ccm + 4,0 ccm 28 % NaOH) in zwei Vorlagen in Mengen von je 10 ccm; Vorlage 5,0 ccm n/400 H_2SO_4—1 % KJO_3; Zusatz von 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I.

Erstes Destillat:	6,15 ccm	n/500 $Na_2S_2O_3$
Zweites „	6,19 „	n/500 $Na_2S_2O_3$
Leertitration:	6,23 „	n/500 $Na_2S_2O_3$

Tabelle VII.

Prüfung des bidestillierten Wassers, welches — während das bisher benutzte nur im zweiten Destillationsgang über H_3PO_4 destilliert wurde — im ersten Destillationsgang über alkalische Permanganatlösung destilliert wurde. Vorlage 5,0 ccm n/400 H_2SO_4—1% KJO_3; Zusatz von 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I.

Leertitration. Zusatz von 15 ccm Aqua bidest.:

6,24, 6,23, 6,24 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;

Destillation des Aqua bidest. alkalisiert (Zusatz von 4,0 ccm 28% NaOH in gleichem Wasser). Vorlage usw. wie oben.

6,25, 6,24, 6,25 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Tabelle VIII.

Destillation von Ammonsulfat: a) direkt, b) mit 0,5 ccm reinster H_2SO_4 60 Minuten im *Kjeldahl*-Kolben erhitzt. Vorlage 10,0 ccm n/400 H_2SO_4—1% KJO_3; Zusatz von 3,0 ccm KJ-Lösung b) aus Tabelle I.

a) 5,88, 5,86 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$; b) 5,94, 5,93 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Tabelle IX.

Pferdeserum wird mit dem elffachen Volumen 5%iger Trichloressigsäure gefällt, das klare Filtrat (je 8,0 ccm) mit je 1,0 ccm 50%iger H_2SO_4, die 1,75 mg $HClO_3$ enthalten, im *Kjeldahl*-Kolben verbrannt. Vorlage usw. wie oben.

a) Verbrennungszeit 80 Minuten: 6,14, 6,16, 6,16 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;
b) Verbrennungszeit 120 Minuten: 6,04, 6,06, 6,04 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Anderes Pferdeserum wie oben:

a) Verbrennungszeit 15 Minuten: 2,88, 2,91, 2,89 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;
b) Verbrennungszeit 60 Minuten: 2,75, 2,74, 2,76 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Tabelle X.

Menschenserum wird mit dem elffachen Volumen 5%iger Trichloressigsäure gefällt, 8,0 ccm des klaren Filtrats werden mit je 1,0 ccm 50%iger H_2SO_4, die 1,75 mg $HClO_3$ enthalten, im *Kjeldahl*-Kolben verbrannt. Vorlage usw. wie in Tabelle VIII.

a) Verbrennungszeit 15 Minuten: 4,98, 5,00, 5,01, 4,99, 4,975 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$;
b) Verbrennungszeit 60 Minuten: 4,97, 5,00, 4,97, 5,00, 4,98 ccm n/500 $Na_2S_2O_3$.

Diskussion.

Aus den vorliegenden Beleganalysen ist zu ersehen, daß es unter Verwendung zahlreicher technischer Verbesserungen gelungen ist, die Genauigkeit der Stickstoffbestimmung zu erhöhen, wobei besonderer Wert darauf gelegt wurde, daß diese Genauigkeit über einen verhältnismäßig großen Spielraum der zu bestimmenden Stickstoffmenge sich erstreckt. Zu diesen Verbesserungen sind noch einige, uns wichtig erscheinende Bemerkungen zuzufügen.

Die Verwendung über H_3PO_4 bidestillierten Wassers, dessen p_H zwischen 7,02 und 6,99 maximal schwankt, hat uns gezeigt, daß auch dieses noch nicht

rein genug ist, um bei der Destillation als vollkommen neutral bei der hier angegebenen Genauigkeit angesehen zu werden. Bereits *Sjollema* und *Hetterschy* (8) haben bemerkt, daß „ein Destillat von gewöhnlichem Wasser sehr ungleich große Mengen von Säure neutralisierte". Wir haben das mit dem im Institut hergestellten destillierten Wasser, das aus einem Kupferkessel mit Glaskühler aus dem Leitungswasser gewonnen wird, bestätigen können. Setzt man zu einer bestimmten Menge der Vorlageflüssigkeit verschiedene Mengen dieses destillierten Wassers zu, so steigt der Titer der Schwefelsäure gleichsinnig mit ansteigendem Wasserzusatz (s. Tabelle III). Auch *neutral* in die Vorlage überdestilliert, hebt es deren sauren Titer (siehe Tabelle IV). Diese schwache Azidität des Wassers wird anscheinend durch CO_2 verursacht, da sie durch kurzes Aufkochen des Wassers vor seiner Verwendung beseitigt werden kann. Wird dagegen das Wasser mit NaOH *alkalisiert* im Mikro-*Kjeldahl* in die vorgelegte Schwefelsäure überdestilliert, so tritt ein Abfall des Vorlagetiters auf (s. Tabelle IV). Wird das destillierte Wasser des Instituts mit H_3PO_4 angesäuert und im Mikro-*Kjeldahl* überdestilliert, so ist keine Veränderung des Schwefelsäuretiters in der Vorlage wahrzunehmen, die außerhalb der Fehlergrenze der Titration selbst liegt. Im gleichen Sinne hatten *Sjollema* und *Hetterschy* festgestellt, daß unreines, destilliertes Wasser nach nochmaliger Destillation über Phosphorsäure bedeutend geringere Fehler ergab; daß dieses Wasser aber, alkalisiert über die *Kjeldahl*-Apparatur destilliert, doch noch Alkalispuren enthielt und in geringfügiger Weise den Schwefelsäuretiter in der Vorlage herabsetzte. Sie schrieben dieses bei der Destillation mitgerissenem Alkali zu und geben eine besondere Vorrichtung in der Apparatur an, die diesen Fehler verringern soll. Wir haben uns mit dieser Merkwürdigkeit eingehend beschäftigt und sind dabei zu folgendem vorläufigem Ergebnis gekommen: In unserem über H_3PO_4 bidestillierten Wasser — ebenso wie auch im Leitfähigkeitswasser von *Kahlbaum* u. a. — befindet sich eine nichtdissoziierte, neutrale Substanz in geringer Menge. Zur Vorlageschwefelsäure in beliebiger Menge zugesetzt, verändert dieses Wasser den Titer der sehr schwachen Säure nicht; in die Schwefelsäure direkt hineindestilliert verhält sich das Wasser ebenfalls neutral; *alkalisiert destilliert, senkt es den Titer der Schwefelsäure.* Da dieses auch noch der Fall war, wenn einerseits eine besondere Apparatur verwendet wurde, die das Mitreißen von Alkali bei besonders langsamer Destillation mit Sicherheit ausschloß, da weiterhin keine Spur der verschiedenen verwendeten Alkalien im Destillat nachzuweisen war, da ferner die in die Vorlage übergegangene Alkalimenge in keinem Verhältnis zur Alkalisierungsstärke des Wassers im Kochkolben stand und da schließlich nachgewiesen werden konnte, daß dieses Wasser — im Becherglas mit starkem Alkalizusatz auf etwa ein Viertel seines Volumens eingedampft und dann in Schwefelsäure destilliert — den Schwefelsäuretiter nicht mehr senkte, war das Mitreißen von Alkali, welches *Sjollema* und *Hetterschy* als Erklärung angeben, sicher auszuschließen. Weitere Versuche hatten gezeigt, daß bei der Destillation stark alkalisierten bidestillierten Wassers im Mikro-*Kjeldahl*-Apparat im ersten Drittel des Destillats mehr Alkali enthalten ist als im zweiten, während das letzte Destillat nach diesen die Schwefelsäure unverändert ließ, trotzdem gerade bei dieser am stärksten alkalischen Lösung das Mitgerissenwerden von Alkali bei ihrer Destillation am allerwahrscheinlichsten war. Schließlich wurde später noch festgestellt, daß das bidestillierte Wasser von dieser störenden Substanz doch noch zu befreien war: das im ersten Kolben gekochte Leitungswasser wurde mit stark alkalischer Permanganatlösung erhitzt, das daraus entstandene kondensierte Destillat wurde ein zweites Mal über Phosphorsäure destilliert. In diesem

zweiten Destillat war die störende Substanz, die hier ausführlich beschrieben wurde, nicht mehr vorzufinden. Dieses Ergebnis deutet gleichfalls darauf hin, daß die störende Substanz organischer Natur sein dürfte und durch die Erhitzung mit alkalischem Permanganat zerstört wird.

Aus diesen Erfahrungen ergibt sich die Vorschrift, daß in die Kolben nach ihrer Abnahme vom Verbrennungsgestell durchweg 25 ccm bidestillierten Wassers zuzusetzen sind. Die Menge des organischen, aus diesem durch nachfolgende Alkalisierung freigesetzten Alkalis, welches in die Vorlage übergeht, bleibt dann stets konstant. Sie tritt bereits bei der Leerbestimmung auf und kann daher bei allen weiteren Destillationen mit in Berechnung gezogen werden. Es ist unschwer, diese Vorschrift auch sicherheitshalber bei dem über Permanganat destillierten bidestillierten Wasser einzuhalten.

Im Leitungswasser selbst, welches schwach alkalisch reagiert, entsteht mit *Nesslers* Reagens eine weißliche Trübung, die auf die Gegenwart von Alkylaminen hinweist. Auch im destillierten Wasser des Instituts waren noch gleichartige Trübungsspuren mit diesem Reagens nachweisbar.

Bei der Verbrennung selbst spielen diese Stoffe gleichfalls eine wichtige Rolle! Die kräftige hydrolytische Spaltung, die ihr Optimum im Verbrennungskolben dann erreicht, wenn nur noch Wasserspuren darin enthalten sind, mithin also die Temperatur des Kolbeninhaltes rasch in die Höhe steigt, vermag neben Ammoniak geringe Mengen primärer Amine zu liefern. Daß diese von der Schwefelsäure nicht zurückgehalten werden, sondern den Kolben flüchtig verlassen, ist einer der bisher unerklärten, noch näher zu untersuchenden Punkte. Daß es — natürlich innerhalb der Fehlergrenze dieser Methode ebenso wie der anfangs zitierten kolorimetrischen — stets die gleichen Mengen flüchtiger Substanzen bei Verbrennung des gleichen Quantums an Ausgangsmaterial sind, gibt gleichfalls zu denken. Daß bei Harnstoff dieser Prozeß ausbleibt, während er bei allen organischen Substanzen, die eine *Säure- und Amino*gruppe enthalten, auftritt, daß die Stellung der NH_2-Gruppe zur COOH-Gruppe über die Menge des flüchtigen Amins ebenso entscheidet wie die verschiedene Länge der Kette bei gleicher Stellung der Aminogruppe zur COOH-Gruppe, haben wir gleichfalls weiterhin feststellen können. Auch in Ringstellung befindliche NH-Gruppen tragen zur Entstehung flüchtiger Amine bei der *Kjeldahl*-Verbrennung bei. Von allen diesen wird, wie wir hier nur kurz streifen wollen, ein Teil durch metallisches Quecksilber zurückgehalten, das zur Zeit der Entstehung dieser Amine noch nicht zu Sulfat umgesetzt wurde. Hier finden wir den Anschluß zu der Erfahrung, daß bei der ältesten Verbrennungsart — mit metallischem Hg — bei nachfolgender Zerlegung der entstandenen und wohlerkannten Quecksilberamine mittels Sulfid oder Thiosulfat vor der anschließenden alkalischen Destillation höhere Stickstoffwerte erhalten werden als ohne Quecksilber. Schließlich bleibt noch zu bemerken, daß es zahlreiche bekannte und unbekannte Substanzen gibt, die der Zerlegung bzw. Überführung ihrer NH-Gruppen

zu $(NH_4)_2SO_4$ einen sehr starken Widerstand entgegensetzen, bei dem auch sehr langdauernde Verbrennung nicht zur Vollständigkeit zu führen braucht. Der Zusatz von Katalysatoren oder Oxydationsmitteln verbessert zwar diesen Punkt, bringt aber gleichzeitig die Gefahr des Ammoniakverlustes durch Überoxydation mit sich. Wie die Beleganalysen an einem Beispiel zeigen, treten bei Verbrennung von Ammoniumsulfat mit Oxydationsmitteln allmählich Stickstoffverluste ein.

Zusammengefaßt entsteht also, wie bereits anfangs angedeutet, eine Art von Kompromiß, da wir — schematisch betrachtet — drei Arten von Substanzen bei der Verbrennung nach *Kjeldahl* im Kolben haben: 1. Stoffe, deren NH-Gruppen leicht zu Ammoniumsulfat übergeführt werden; 2. Alkylamine, die flüchtig sind und daher den Kolben verlassen können; 3. Stoffe, deren NH-Gruppen der oxydierenden Wirkung der Schwefelsäure einen größeren Widerstand entgegenstellen als Ammoniumsulfat selbst. Aus diesen Punkten ist zu ersehen, daß die feuchte Verbrennung nach *Kjeldahl* ein beschränktes Verwendungsgebiet besitzt. Die wohlbekannte Tatsache, daß die Stickstoffbestimmung nach *Dumas* fast stets höhere Stickstoffwerte ergibt als die Bestimmung nach *Kjeldahl*, hat hiermit einigermaßen Aufklärung gefunden. *Die einzige uns bisher bekannte Ausnahme bildet der Harnstoff, der daher zur Nachprüfung von Stickstoffbestimmungsmethoden mit feuchter Verbrennung nur mit Vorbehalt zu verwenden ist!*

Die bei der Destillation entstehenden Fehler, deren Grund zwar ermittelt und letzten Endes beseitigt werden konnte, deren substantielle Ursache aber noch nicht eindeutig klargestellt ist, können im Gegensatz zu den bei der Verbrennung nach *Kjeldahl* entstehenden berechnet werden.

Das bekanntermaßen bei der jodometrischen Titration eintretende „Nachbläuen" der vorher farblosen Flüssigkeit ist eine wohlbekannte Fehlerquelle, deren Ursachen noch heute nicht einwandfrei aufgeklärt sind. Es ist bekannt, daß bei sehr raschem Titrieren, d. h. Zulauf der Thiosulfatlösung, ein geringeres Quantum derselben bis zur Erreichung der Farblöslichkeit notwendig ist als bei sehr langsamer Titration, daß aber dafür das Nachbläuen der Flüssigkeit um so rascher und intensiver einsetzt als bei langsamer Titration. Dies legt den Gedanken nahe, daß bereits *während der Titration selbst* Nachbläuen statthat; hieraus kann man schließen, daß ein Wiederfreiwerden des Jods infolge Dissoziation die Ursache sein dürfte, zumal es erwiesen ist, daß auf der einen Seite das Nachbläuen beim Arbeiten mit sehr verdünnten Lösungen stärker hervortritt als bei sehr konzentrierten, auf der anderen, daß Erhöhung der Salzkonzentration bei sehr verdünnten Lösungen das Nachbläuen wesentlich zurückdrängt. Ferner konnten wir feststellen, daß der Gehalt an Ammoniumsulfat insofern auf das Nachbläuen eine Ein-

wirkung ausübt, als seine Erhöhung das Nachbläuen verstärkt. Es lag daher nahe, zu versuchen, ob durch Aceton- oder Methanolzusatz diese Dissoziationsprozesse zurückgedrängt und damit das Nachbläuen vermindert oder aufgehoben werden würde. Aus vielen Versuchen in dieser Richtung sind wir zu dem angegebenen Gemisch gekommen, welches gleichzeitig den Zerfall des Kaliumjodids im gleichen Sinne verhindert. Stärkere Konzentration von Aceton-Methanol beeinträchtigt wiederum die Jodstärkereaktion: es tritt eine schmutzig rote Farbe an die Stelle der rein blauen. Bei Zusatz von Glycerin wird ein gleicher Effekt erzielt, dabei machen sich aber die Alkoholgruppen insofern bemerkbar, als sie, in alkalischer Richtung wirksam, einen Teil der freien Schwefelsäure neutralisieren und damit die Titration stören. Bei Methanol macht sich die Alkoholgruppe nicht bemerkbar. Was den Einfluß der Luftkohlensäure betrifft, so ist dieser in der hier angegebenen Versuchsanordnung ebenfalls ausgeschaltet. Selbst wenn noch bei der Titration heftiges Rühren mit dem Rührstab Luft in die Vorlageflüssigkeit hineinbringt, sind weder Veränderung des Titrationswertes noch späteres Nachbläuen daraufhin festzustellen.

Wohlbemerkt gelten alle diese technischen Einzelheiten nur für das hier beschriebene System, das eine ziemlich weite Beweglichkeit bez. der zu bestimmenden Stickstoffmengen erlaubt. Für andere Flüssigkeitskonzentrationen werden aber unschwer an Hand der hier mitgeteilten Verhältnisse gleichfalls günstige Bedingungen zu ermitteln sein.

Literatur.

1) *A. Friedrich*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **216**, 68, 1933. — 2) *C. C. Erdmann*, J. of biol. Chem. **8**, 41, 1910; *H. D. Dakin* u. *H. W. Dudley*, ebenda **17**, 275, 1914. — 3) *H. J. Fuchs*, Zeitschr. f. exper. Med., **98**, 70, 1936. — 4) *H. J. Fuchs* u. *M. v. Falkenhausen*, diese Zeitschr. **245**, 304, 1932. — 5) *H. J. Fuchs*, Mikrochem. **8**, 159, 1930. — 6) Noch unveröffentlicht. — 7) *I. Bang*, diese Zeitschr. **88**, 416, 1918. — 8) *B. Sjollema* u. *C. W. G. Hetterschy*, ebenda **84**, 359, 1917.

Über Struktur und Eigenschaften der Esterasen.

II. Mitteilung[1]:

Ein Zusammenhang zwischen Ascorbinsäure und Leberesterase.

Von

W. v. Pantschenko-Jurewicz und **H. Kraut.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Arbeitsphysiologie Dortmund-Münster.)

(Eingegangen am 13. Februar 1936.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In unserer ersten Untersuchung über Struktur und Eigenschaften der Esterasen sind wir zu der Anschauung gelangt, daß diese aus einem Symplex[2] von zwei Komponenten bestehenden Enzyme mit ihren Komponenten, dem Esterase-agon (aktive Gruppe) und dem Esterasepheron (Träger), in einem durch Massenwirkung geregelten Gleichgewicht stehen. Nur der Symplex besitzt die enzymatische Aktivität. Das Agon ist für sich nicht beständig, sondern wandelt sich, wenn es nicht durch einen großen Pheronüberschuß im Symplex festgehalten wird, in eine nicht mehr zur Symplexbildung befähigte Verbindung, in Anagon um.

Wir haben nun begonnen, die Komponenten der Esterasen kennenzulernen. Dabei wurden wir durch die Beobachtung von *O. W. Palladin*[3], daß bei skorbutischer Erkrankung der Esterasegehalt des Blutes vermindert ist, auf die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen C-Vitamin und Esterase aufmerkam. Es zeigt sich in der Tat, daß Zusatz von Ascorbinsäure die Esterspaltung durch gereinigte Leberesterase vermehrt und sogar bei vollkommen unwirksamem Pheron Esterasewirkung hervorruft. Die Präparate der Leberesterase geben im Gegensatz zu dem enzymatisch unwirksamen Pheron charakteristische chemische Reaktionen auf C-Vitamin. Es war daher zu untersuchen, in welcher Weise die Ascorbinsäure auf das Esterasepheron einwirkt, und ob sie das Pheron zum Esterasesymplex selbst ergänzt.

Es ist bemerkenswert, daß die Leberesterase durch Ascorbinsäure nur aktiviert wird, wenn durch Reinigung die Hauptmenge der bei der Extraktion in Lösung gehenden Begleitstoffe entfernt, und wenn dazu noch eine Anreicherung des Esterasepherons erfolgt ist. In den ammoniakalischen Auszügen aus getrockneter Schweineleber bewirkt der Zusatz von Ascorbinsäure nämlich keine Steigerung der Spaltung von Methyl-

[1] I. Mitteilung: *Heinrich Kraut* u. *Wolodymyr v. Pantschenko-Jurewicz*, diese Zeitschr. **275**, 114, 1934. — [2] *R. Willstätter* u. *M. Rohdewald*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **225**, 103, 1934. — [3] Diese Zeitschr. **152**, 420, 1924.

butyrat. Auch in den nach dem Verfahren unserer I. Mitteilung mit Bleiphosphat gereinigten Präparaten, die Esterasewerte von 60 bis 160, also sehr beträchtliche Reinheitsgrade besitzen, ist meist der Zusatz von Ascorbinsäure noch ohne Wirkung. Erst wenn man diese Lösungen zur Entfernung des Agons mit Kieselgur behandelt und dadurch die enzymatische Aktivität erheblich vermindert, werden die Präparate durch Ascorbinsäure aktivierbar. Z. B. stieg die Wirkung von 100 ccm einer so vorbehandelten Esteraselösung von 8,0 E. E. durch Zusatz von 1 mg Ascorbinsäure auf 10,3 E. E., durch 2 mg Ascorbinsäure auf 13,7 E. E., also um 70 %. In wirksamer gebliebenen Lösungen, die noch mehr Agon enthalten, ist auch der Erfolg des Ascorbinsäurezusatzes geringer. Ein Präparat, das nach der Behandlung mit Kieselgur noch 2,9 E. E. in 1 ccm enthielt, wurde durch Zusatz von 1 mg Ascorbinsäure nur auf 3,3 E. E. gebracht, ein anderes durch 3 mg Ascorbinsäure pro ccm von 2,45 auf 3,2 E. E. Die Wirkung der Ascorbinsäure kommt also nur dann zum Vorschein, wenn ein großer Teil des Pherons in freier Form vorliegt.

Die Steigerung der Wirksamkeit durch Ascorbinsäure ist eine Zeitreaktion; sofort nach dem Zusatz ist sie oft noch nicht zu beobachten, nach $^1/_2$ Stunde ist sie deutlich, nach 2 bis 4 Stunden wird die volle Wirksamkeit erreicht. Kann zu den Ansätzen Luft hinzutreten, so nimmt meist in einigen Stunden die Aktivität ab. Dies geschieht auch in saurer Lösung, so daß die durch Ascorbinsäure aktivierte Esterase wesentlich sauerstoffempfindlicher erscheint als die Esterase selbst. Wir fanden, daß diese Empfindlichkeit auf die Hemmung der Esterase durch die Dehydroform der Ascorbinsäure zurückzuführen ist. Wenn man den Zutritt von Sauerstoff vollständig verhindert, bleibt die erreichte Aktivität tagelang erhalten.

Die Wirkung der Ascorbinsäure besteht nicht in einer Aktivierung des Esterasesymplexes, denn sie ist, wie die erwähnten Beispiele zeigen, nicht abhängig von der Menge des noch vorhandenen Symplexes. Die Gegenwart von Agon oder Symplex ist vielmehr für die Steigerung der Wirkung unwesentlich. Als es uns nämlich nach dem Vorbild von *H. Theorell*[1] gelang, durch Dialyse gegen verdünnte Salzsäure den Esterasesymplex aufzuspalten und das Esterasepheron vollständig vom Agon abzutrennen, fanden wir, daß auch das für sich allein völlig unwirksame Pheron durch Ascorbinsäure von neuem esterspaltende Wirkung erhält. Wir dialysieren z. B. die nach dem Verfahren unserer I. Mitteilung mit Bleiphosphat gereinigten Präparate, die noch ungefähr 1 E. E. in 1 ccm enthalten, einige Tage gegen n/100 Salzsäure. Jede Wirkung auf Methylbutyrat ist dann verschwunden. Die Lösung enthält noch viel Eiweiß; es bleibt aber dahingestellt, wie weit dieses mit dem

[1] Diese Zeitschr. **272**, 155, 1934.

Pheron identisch ist. In einer gemeinsam mit *H. Fromherz* (München) ausgeführten Untersuchung, über die wir in kurzem berichten werden, wurde festgestellt, daß gereinigte Leberesteraselösungen ein Ultraviolettspektrum mit einer scharf ausgebildeten Bande bei 276 mμ besitzen. Bei der Dialyse gegen Salzsäure verschwindet auffallenderweise dieses charakteristische Spektrum. Eine so gewonnene Pheronlösung versetzten wir mit 0,5 mg Ascorbinsäure pro ccm und fanden nach 20 Minuten in 5 ccm 0,13 E. E., nach 2 Stunden 0,17 E. E., also ungefähr ein Dreißigstel der vor der Dialyse vorhandenen enzymatischen Aktivität. Ein anderes Pheronpräparat wurde durch 1 mg Ascorbinsäure pro ccm auf 0,35 E. E. in 5 ccm gebracht. Durch 5 mg Ascorbinsäure pro ccm erhielten wir die bisher größte Wirksamkeit von 0,45 E. E. aus 5 ccm Pheronlösung, also fast 10% des vor der Dialyse vorhandenen.

Bei der Gewinnung von Esterase aus Ascorbinsäure und unwirksamem Pheron handelt es sich also nicht mehr um die Steigerung einer vorhandenen Aktivität, sondern um die Bildung eines Enzyms aus unwirksamen Komponenten. So hat *H. Theorell* (l. c.) das gelbe Atmungsferment aus der Flavinkomponente und dem durch Dialyse dargestellten Träger und *K. Agner*[1] die Leberkatalase aus ihren nach demselben Verfahren getrennten Komponenten zusammengesetzt. Ist aber die so dargestellte Esterase dieselbe, wie die aus der Leber gewonnene, dann muß sich die Ascorbinsäurekomponente durch die charakteristischen Ascorbinsäurereaktionen auch in der Leberesterase nachweisen lassen. Tatsächlich besitzen die Extrakte aus Lebertrockenpulver die starke Reduktionswirkung der Ascorbinsäure. Sie reduzieren nach dem Ausfällen der Eiweißstoffe Silbersalze in saurer Lösung, entfärben Jod in saurer Lösung und Dichlorphenolindophenol, das *Tilmans*sche Reagens auf Ascorbinsäure.

Die wichtigsten Bedingungen für einen Zusammenhang zwischen dem Agon der Esterase und der Ascorbinsäure: die Reduktionswirkung der Esterasepräparate und die Bildung von Esterase aus Pheron und Agon sind also erfüllt. Aber die in den Leberesteraselösungen nachweisbaren Ascorbinsäuremengen sind wesentlich geringer als die zur Esterasebildung aus Pheron notwendigen. Nach ihrem Jodverbrauch enthalten die ammoniakalischen Extrakte aus Schweinelebertrockenpulver 4 bis 10 γ Ascorbinsäure auf 1 E. E. (unter der Annahme, daß die gesamte Reduktionswirkung gegen Jod in saurer Lösung von Ascorbinsäure verursacht sei). Bei der ersten Reinigung durch Bleiphosphatvoradsorption vermindert sich der Jodverbrauch pro E. E. noch beträchtlich, z. B. von 4 auf 1 γ. Bei den folgenden Reinigungsoperationen aber bleibt der Reduktionswert einer E. E., unabhängig von der Enzym-

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **235**, 2, 1935.

ausbeute der einzelnen Reinigungsstufen, erhalten. Es besteht also, abgesehen von dem Extrakt selbst, eine deutliche Parallelität zwischen dem Reduktionsvermögen und der enzymatischen Aktivität. Die gereinigten Präparate enthalten innerhalb der Bestimmungsfehler ziemlich konstant 0,5 bis 1 γ Ascorbinsäure pro E. E. Das Reduktionsvermögen verschwindet bemerkenswerterweise zugleich mit der Esterasewirkung bei der Dialyse gegen Salzsäure, die zur Darstellung des Pherons dient. Die Ascorbinsäuremengen aber, die zur Bildung von Esterase aus dem Pheron notwendig sind, betragen mehr als das 1000fache der in den gereinigten Präparaten nachweisbaren Ascorbinsäure, nämlich einige mg auf jede gebildete Esteraseeinheit.

Es könnte vermutet werden, daß die Wirkung der Ascorbinsäure in einer Reduktion von oxydierter und dadurch unwirksam gewordener Esterase bestehe. Dieser Vorgang würde eine Parallele darstellen zu der Inaktivierung und Reaktivierung des Papains, die von *Th. Bersin*[1] als Oxydation der wirksamen SH-Verbindung zur unwirksamen SS-Verbindung bzw. als die Überführung der SS-Form in die SH-Form aufgefaßt werden. In ähnlicher Weise wird auch die Aktivierung von Arginase, Kathepsin und anderen Enzymen[2] durch Ascorbinsäure betrachtet. Aber dieser Annahme stehen im Falle der Leberesterase schwerwiegende Bedenken entgegen. Sie erklärt vor allen Dingen nicht, weshalb erst die pheronreichen Präparate und das Pheron selbst eine Steigerung der Aktivität durch Ascorbinsäure erfahren. Bei der Darstellung der Esterasepräparate sind Wirksamkeitsabnahmen durch Oxydation nicht zu beobachten. Wenn also das Ferment überhaupt in oxydierter, unwirksamer Form in den Leberextrakten vorhanden ist, so müßte die Steigerung der Wirksamkeit durch Reduktion auf jeder Stufe der Reinigung eintreten. Auch ist die Darstellung des Pherons zwar von einem Verschwinden der letzten Reduktionswirkung begleitet, aber nicht durch Oxydation, sondern durch Abtrennung der reduzierenden Substanz. Der Zusatz von Salzsäure ohne Dialyse genügt nämlich nicht zur Aufspaltung des Symplexes der Leberesterase, obwohl wir hierbei den Zutritt von Luftsauerstoff durch Offenstehenlassen der Gefäße absichtlich nicht verhindert haben. Vielmehr darf angenommen werden, daß es bei der neuen Symplexbildung die Ascorbinsäure selbst ist, die mit dem Pheron reagiert. Dafür spricht besonders die erwähnte Hemmung der Enzymwirkung durch die oxydierte Form der Ascorbinsäure. Die Hemmung ist verständlich, wenn auch die Dehydroascorbinsäure — und sogar besonders diese — sich mit dem Pheron verbindet, diese Verbindung aber kein Katalysator der Esterspaltung ist.

[1] Ergebn. d. Enzymforschung **4**, 68, 1935. — [2] *Edlbacher* u. *Leuthardt*, Klin. Wochenschr. **12**, 1843, 1933; *Karrer* u. *Zehnder*, Helv. Chim. Acta. **16**, 701, 1933.

Die Konkurrenz zwischen Ascorbinsäure und ihrer Dehydroform um das Pheron ist aber nicht ausreichend für die Erklärung der großen Unterschiede zwischen den in den Enzymlösungen nachweisbaren und den zur neuen Symplexbildung erforderlichen Ascorbinsäuremengen. Die Ascorbinsäure wird also nicht das Agon der Esterase selbst sein. Wir erinnern nun an die Ergebnisse unserer ersten Untersuchung über die Struktur der Esterasen, wonach nicht nur zwischen Agon, Pheron und Symplex ein Gleichgewicht besteht, sondern in dieses ein anderer Prozeß, die Umwandlung des Agons in ein nicht mehr zur Symplexbildung befähigtes Anagon hineinspielt. Die beobachteten Tatsachen decken sich mit der Annahme, daß die Ascorbinsäure das Anagon der Leberesterase ist, so daß sie erst nach einer gewissen Umwandlung in eigentliches Agon befähigt ist, mit dem Pheron den Esterasesymplex zu bilden.

Ohne daß ein besonderer Anhaltspunkt dafür vorhanden wäre, lassen unsere Versuche noch die Möglichkeit zu, daß bei der Bildung des Agons sich die Ascorbinsäure mit einer weiteren Substanz chemisch verbindet, wie beim gelben Atmungsferment das Flavin erst nach Veresterung mit Phosphorsäure zur Vereinigung mit der Trägerkomponente befähigt ist[1]. In unserem Falle würde die Vereinigung mit der dritten Substanz aber nur eine Steigerung der Fermentwirkung mit sich bringen, da auch die Ascorbinsäure allein mit dem Pheron ein katalytisch wirksames System bildet.

Nach Angaben von *H. v. Euler* und *Svensson* aktiviert die Ascorbinsäure auch die Wirkung der Hefephosphatase. Wir betrachten das als einen Hinweis darauf, daß auch andere Esterasen einen der Leberesterase entsprechenden Bau besitzen können[2].

Die Mitwirkung der Ascorbinsäure am Aufbau des Esterasesymplexes im lebenden Organismus wird dadurch bewiesen, daß man durch Einspritzung von Ascorbinsäure den Esterasegehalt von Blut und Organen erhöhen kann. Nach intravenöser Zufuhr von Ascorbinsäure finden wir beim Hund eine Erhöhung der Methylbutyratspaltung im hämolysierten Blut. Allerdings tritt diese Steigerung nicht sofort ein, sondern meist erst im Verlauf von 1 bis 2 Stunden. Nach den Versuchen von *F. Plaut* und *M. Bülow*[3] verschwindet injizierte Ascorbinsäure innerhalb 5 Minuten aus der Blutbahn. Sie wird nach unseren Feststellungen vor allem in der Leber gespeichert. Wahrscheinlich erfolgt dort die Bildung des Agons und dadurch auch die von neuem Esterasesymplex, der dann allmählich in die Blutbahn übergeht. Um den Verbleib der Ascorbinsäure festzustellen, untersuchten wir nämlich den Esterase- und Lipasegehalt von Pankreas und Leber nach länger

[1] *H. Theorell*, diese Zeitschr. **278**, 263, 1935. — [2] Svensk. Kem. Tidskr. **47**, 16, 1935. — [3] Zeitschr. f. physiol. Chem. **236**, 241, 1935.

dauernder Ascorbinsäurezufuhr bei Meerschweinchen. Wir fanden in den Bestimmungen mit den Leberpräparaten der Meerschweinchen, die 10 Tage lang je 10 mg Ascorbinsäure erhalten hatten, die Methylbutyrat- und Tributyrinspaltung beträchtlich erhöht, während in den Pankreaspräparaten keine Änderung der Tributyrinspaltung bemerkbar war. Die erwähnten Versuche von *O. W. Palladin* über Blutfermente bei experimentellem Skorbut stellen eine Umkehrung dieses Vorganges dar. Er fand bei den skorbutischen Meerschweinchen eine deutliche Verminderung der Lipase im Serum, während bezeichnenderweise die anderen von ihm bestimmten Enzyme Katalase und Arginase gegenüber der Norm nicht vermindert waren. Der Skorbut ist also ein Beispiel für eine schwere Störung des Fermenthaushaltes, die den normalen Stoffwechsel behindert und man könnte ihn in dieser Beziehung als eine Fermentmangelkrankheit bezeichnen. Die hierdurch gewonnene Einsicht in den Fermenthaushalt eröffnet neue Möglichkeiten zur Behandlung von derartigen Stoffwechselstörungen, deren maßgebende Ursache bisher nicht erkannt wurde.

Experimenteller Teil.

1. Aktivitätssteigerung von Leberesterasepräparaten durch Ascorbinsäure.

Alle verwendeten Leberesterasepräparate sind aus Schweineleber dargestellt, die wie üblich mit Aceton und Äther getrocknet und dann mit n/40 Ammoniak extrahiert wurde. Das Verfahren der Reinigung war stets zweimalige Voradsorption mit Bleiphosphat, wie sie in unserer I. Mitteilung auf S. 129ff. beschrieben ist. An die zweite Voradsorption schloß sich, wenn nichts anderes bemerkt wird, eine Adsorption der Esterase an Bleiphosphat und Elution mit n/10 Essigsäure. Später stellte sich heraus, daß bei der Elution mit n/4 Ammoniak die Ausbeute wesentlich größer wird. Diese Präparate waren zu unseren Versuchen ebenso geeignet.

Die Aktivität der ammoniakalischen Extrakte wird durch Ascorbinsäure nicht verändert. Nach zweimaliger Voradsorption, Adsorption an Bleiphosphat und Elution konnte nur einmal eine leichte Steigerung der Wirksamkeit durch Ascorbinsäure festgestellt werden. Deutlich wird die Aktivitätssteigerung erst, nachdem durch Kieselgur ein großer Teil der Aktivität entfernt ist.

Wir schüttelten 100 ccm eines Präparates, das nach der Elution 1,05 E. E. in 1 ccm enthielt, mit 0,5 g Kieselgur und zentrifugierten sofort ab. Es waren noch 0,84 E. E. in 1 ccm vorhanden. 1 mg Ascorbinsäure pro ccm steigerte die Wirkung nicht meßbar. Andere 100 ccm schüttelten wir 1 Stunde mit 0,5 g Kieselgur. Danach befanden sich noch 0,33 E. E. in 1 ccm, die durch 1 mg Ascorbinsäure auf 0,35 E. E. gebracht wurden. Wurde die Lösung aber mit 0,5 g Kieselgur über Nacht geschüttelt, so blieb nur noch die Aktivität von 0,14 E. E. pro ccm zurück, und diese wurde durch 0,1 mg Ascorbinsäure pro ccm auf 0,21 E. E. gebracht.

Die Behandlung mit Kieselgur bringt nach den Erfahrungen unserer ersten Untersuchung* eine Abtrennung des Agons mit sich, allerdings nur, wenn die Vorreinigung bis zu einem erheblichen Reinheitsgrad fortgeschritten ist. Unreinere Präparate erfahren durch Kieselgur weder eine Abnahme ihrer enzymatischen Wirksamkeit, noch sind sie durch Ascorbinsäure zu beeinflussen. Die Aktivitätssteigerung durch Ascorbinsäure ist also an das Vorhandensein eines großen Pheronüberschusses gebunden. In der Tabelle I sind die Aktivitätssteigerungen an den mit Kieselgur behandelten Präparaten zusammengestellt. Die Ascorbinsäure wurde in Wasser gelöst zugesetzt (1 mg in 1 ccm). In der Tabelle sind die Werte auf das ursprüngliche Volumen umgerechnet. Sie verzeichnet immer die höchsten Werte im zeitlichen Verlauf der Aktivitätssteigerung.

Tabelle I.

Steigerung der Aktivität von Leberesterase durch Ascorbinsäure.

Nr.	Wirksamkeit vor der Behandlung mit Kieselgur E. E./ccm	Wirksamkeit nach der Behandlung mit Kieselgur E. E./ccm	Zusatz von mg Ascorbinsäure pro ccm	Wirksamkeit nach Ascorbinsäurezusatz E. E./ccm	Zuwachs in %	Bemerkungen
1	3,2	2,45	3	3,7	51	
	3,2	2,8	3	3,2	30	
	3,2	2,4	3	2,7	13	
2	5,0	4,1	3	5,6	37	
3	0,7	0,08	0,01	0,103	30	Gemessen in 25 ccm
	0,7	0,08	—	0,17	100	
	0,7	0,08	—	0,126	63	Orangensaft statt Ascorbinsäure
4	1,05	0,14	0,1	0,21	50	

Wie die Herausnahme des Agons durch Kieselgur ist auch die Aktivitätssteigerung durch zugesetzte Ascorbinsäure keine rasch verlaufende Reaktion. 20 Minuten nach dem Zusammengeben ist die Wirkung meist eben erkennbar, das Maximum wird in 2 bis 4 Stunden erreicht (s. Tabelle II). Eine Abnahme der Wirkung infolge der Oxydation

* *Berichtigung.* In der Tabelle II auf S. 132 unserer I. Mitteilung (diese Zeitschr. **275**, 114, 1935) ist uns in Spalte 1 ein Druckfehler unterlaufen. Die dort verzeichneten Esterasemengen sind durchweg nicht in 1 ccm, sondern in 5 ccm enthalten. Es muß also heißen: in Versuch

1. 0,51 E.-E. in 5 ccm
2. 0,51 E.-E. in 5 ccm
3. 0,125 E.-E. in 5 ccm
   0,4 B.-E. in 5 ccm

In Spalte 2 beziehen sich dagegen die Mengen wie in der Tabelle angegeben auf 1 ccm.

Tabelle II. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung und Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

Präparat Nr.	p_H	Esteraseeinheiten in 1 ccm							
		vor dem Ascorbinsäurezusatz	sofort nach dem Ascorbinsäurezusatz	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 3 Std.	nach 4 Std.	am anderen Tag	höchste erreichte Steigerung in %
5	um 7	0,5	0,5	0,7	—	0,8	0,9	0,7	80
6	„ 7	2,9	2,9	2,9	3,3	—	—	3,1	14
7	6,2	0,3	0,4	0,5	0,5	—	0,4	0,3	67
	4,8	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,4	0,4	—
	3,7	0,3	0,3	0,4	0,4	—	0,3	0,3	—
	3,1	0,3	—	0,3	0,5	—	0,5	0,5	—

durch Luftsauerstoff tritt nur ganz allmählich ein. Die Empfindlichkeit dieser Präparate gegen Oxydation ist wesentlich kleiner als die des aktivierten Pherons. Die Versuchsansätze der Tabelle II wurden stets bei 30^0 aufbewahrt.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen variierte zwischen p_H 3 und 8, ohne daß ein merklicher Einfluß auf die maximale Steigerung zutagegetreten wäre. Nur die Geschwindigkeit scheint in der Nähe des Neutralpunktes etwas größer zu sein. Außerdem ist in den stärker sauren Lösungen (p_H um 3) die Stabilität der erreichten Wirkung größer.

Das Präparat Nr. 6 wurde sowohl mit Glutathion (50 mg auf 20 ccm Esteraselösung) versetzt, wie auch mehrere Stunden mit Schwefelwasserstoff behandelt. In beiden Versuchen blieb die Aktivität auf 0,3 E. E. pro ccm unverändert stehen. Auch dies spricht dagegen, daß die Aktivitätssteigerung durch Ascorbinsäure in einer einfachen Reduktion (z. B. von SS- zu SH-Gruppen) besteht.

2. Darstellung von agonfreiem Pheron und seine Reaktivierung durch Ascorbinsäure.

Als Ausgangsmaterial verwenden wir die Elutionen aus der Bleiphosphatadsorption, ohne Behandlung mit Kieselgur. Diese Lösungen besitzen noch eine starke Aktivität z. B. von 1 bis 2 E. E. pro ccm und waren in fast allen Fällen vollkommen stabil. Der Reinheitsgrad lag meist zwischen E. W. 60 und 80. Bei dem Präparat Nr. 3 der Tabelle III wurde nach der Bleiphosphatadsorption und Elution noch eine Adsorption an Polyaluminiumhydroxyd A ausgeführt und die Esterase mit n/4 Ammoniak eluiert. Auf die Darstellung und den Reinheitsgrad des agonfreien Pherons war dies ohne erkennbaren Einfluß.

100 bis 200 ccm dieser Lösungen dialysierten wir durch Cellophanbeutel oder Hammelblinddärme gegen 2 Liter n/100 Salzsäure. Täglich einmal wurde die salzsaure Außenflüssigkeit erneuert. Im Laufe von einigen Tagen tritt vollständiger Zerfall des Symplexes und Entfernung des Agons ein (siehe Tabelle III). Nach dem Verschwinden der Aktivität dialysieren wir noch 1 bis 2 Tage gegen reines Wasser, um die eingedrungene Salzsäure

Tabelle III. Darstellung von Esterasepheron durch Dialyse.

Darstellung Nr.	Vor der Dialyse E. E./ccm	Während der Dialyse E. E. /ccm	Während der Dialyse nach Tagen	Gesamte Dauer der Dialyse (ohne Entfernung der Salzsäure) Tage	Verblieben E. E. /ccm	Trockengewicht in 1 ccm mg	Glühgewicht in 1 ccm mg	Dialysiermembran
1a	4,0	2,9	3/4					
	(E. W. 40)	0,15	2	4	0,00	0,29	0,10	Cellophan
1b	4,0			1,5	0,01	0,42	0,10	Hammelblinddarm
2	1,2	0,05	2	3	0,00	0,16	0,00	Dasselbe
3	0,97			3	0,00	0,33	0,00	„
4	0,97			3	0,00	0,23	0,00	„
5	1,00			4	0,00	0,16	0,00	„

möglichst zu entfernen. Gut gereinigte Ausgangslösungen bleiben während der Dialyse und beim Aufbewahren vollkommen klar, weniger reine trüben sich, ohne daß dadurch die Reaktivierbarkeit wesentlich verändert wird. Aber auch die klaren Lösungen geben noch Eiweißreaktionen. Präparat Nr. 2 gab mit 5 ccm deutliche Millon- und Xanthoproteinreaktion, dagegen trat beim Ansäuern kein Niederschlag mehr auf.

Zu den Reaktivierungen versetzten wir die bis zu neutraler Reaktion dialysierten Pheronlösungen mit kristallisierter Ascorbinsäure, die sich rasch auflöste. Die Lösungen wurden fast immer mit Stickstoff durchgespült und unter Stickstoff aufbewahrt. Jedoch enthielt der Stickstoff noch etwa 2% Sauerstoff. Auch wurde bei der Entnahme von Proben der Zutritt von Luftsauerstoff nicht vollständig verhindert. Es bewirkte eine kleine Vermehrung der Reaktivierung, als wir den Sauerstoffgehalt des Stickstoffs durch Pyrogallol oder Hydrosulfit noch weiter herabdrückten (s. letzte Zeile der Tabelle IV.)

Auch die Reaktivierung des Pherons erfolgt langsam, aber immerhin rascher als die Aktivitätssteigerung der mit Kieselgur behandelten Esteraselösungen. In 2 Stunden war in allen Fällen das Maximum erreicht, worauf eine Abnahme der Aktivität einsetzte. Diese Abnahme ließ sich vollkommen vermeiden durch Überschichten der Lösung mit einer etwa 1 cm hohen Schicht von Paraffinöl, die jede weitere Oxydation der Ascorbinsäure verhindert. In der Tabelle IV sind einige charakteristische Beispiele von Reaktivierungen zusammengestellt. Die erreichte Wirksamkeit hängt stark von der Menge der zugesetzten Ascorbinsäure ab. Bis zur Ascorbinsäurekonzentration von 1 mg pro ccm war die Aktivität der zugesetzten Menge Ascorbinsäure ungefähr proportional, größere Zusätze steigerten zwar noch die Enzymwirkung, aber in wesentlich geringerem Ausmaß.

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wollten wir einen Reaktivierungsansatz, der mit gelöster Ascorbinsäure ausgeführt worden war, am anderen Tage mit derselben Ascorbinsäurelösung wiederholen. Er verlief vollkommen negativ, obwohl noch etwas mit Jod titrierbare Ascorbin-

Tabelle IV.

Aktivierung von Esterasepheron durch Ascorbinsäure.

Pheronpräparate der Tabelle 3 Nr.	Zugesetzte mg Ascorbinsäure pro ccm	Aktivität in E. E. in 5 ccm						
		sofort	nach $^1/_2$ Std.	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 4—5 Std.	am anderen Tag	Bemerkungen
	0,5	0,13			0,17			
4	0,5	0,30	0,26	0,21	0,15	0,03		
3	1,0	0,21	0,15		0,15		0,00	Versuch der Stabilisierung mit Glutathion 1 mg auf 1 mg Ascorbinsäure
3	1,0	0,15					0,21	Dieselbe Pheronlösung mit Paraffinöl überschichtet
2	0,04	0,00		0,00	0,05		0,05	Mit Stickstoff durchgespült
	0,125	0,00	0,05	0,05	0,08			
	0,25	0,08		0,05				
	0,50	0,12		0,10				
	1,0	0,24	0,28		0,20			
	5,0	0,44	0,30		0,17			
	1,0	0,21	0,24	0,10				Ohne Spülung mit Stickstoff
	1,0	0,17	0,35					Stickstoff durch Pyrogallol geleitet

säure in der Lösung vorhanden war. Die Gegenwart der inzwischen entstandenen Dehydroascorbinsäure verhinderte also die Reaktivierung durch den noch vorhandenen Rest von Ascorbinsäure. Für das rasche Absinken der Aktivität beim Stehen ohne Sauerstoffausschluß ist daher auch die Bildung von Dehydroascorbinsäure verantwortlich zu machen. Wahrscheinlich beruht ihre Wirkung darauf, daß sie sich ebenfalls mit dem Pheron verbindet, aber zu einem lipatisch unwirksamen Symplex. Der folgende Versuch bestätigt die Hemmung durch Dehydroascorbinsäure.

Wir versetzten 40 ccm einer Pheronlösung mit 40 mg kristallisierter Ascorbinsäure. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde zur Bestimmung der Reaktivierung verwendet. In 5 ccm fanden sich sofort nach dem Auflösen der Ascorbinsäure 0,19 E. E., nach $^1/_2$ Stunde 0,24, nach $1^1/_2$ Stunden 0,46 E. E. Die zweite Hälfte des Ansatzes wurde sofort nach der ersten Messung mit 100 mg Ascorbinsäure in 10 ccm versetzt, die durch 20 Minuten langes Einleiten von Luft teilweise oxydiert waren. (Nach der Jodtitration waren 20% Dehydroascorbinsäure gebildet.) Trotzdem also im zweiten Ansatz neben 20 mg Dehydroascorbinsäure die fünffache Menge reduzierter Ascorbinsäure vorhanden war, betrug die Aktivierung von 5 ccm nach $^1/_2$ Stunde nur 0,09 E. E., nach $1^1/_2$ Stunden 0,19 E. E. Zwei Wiederholungen dieses Versuchs brachten dasselbe Ergebnis.

3. Die Reduktionswirkung der Leberesterase.

Zur qualitativen Feststellung des starken Reduktionsvermögens von Leberesterasepräparaten eignet sich die Reduktion von Silbersalzen in saurer Lösung und von Dichlorphenol-indophenol. Leider ist letzteres zur quanti-

tativen Bestimmung schlecht verwendbar, da der Umschlag von farblos nach rosa in saurer Lösung infolge der stärkeren gelblichen Eigenfarbe der Leberesterasepräparate nicht mit genügender Schärfe zu erkennen ist. Wir fällen aus den wenig vorgereinigten Lösungen das Eiweiß durch Säurezusatz. Aber auch die reineren Lösungen, in denen Säure keinen Eiweißniederschlag mehr hervorruft, versetzen wir mit demselben Volumen 30%iger Schwefelsäure, um durch die starke Säure den Symplex möglichst aufzuspalten. Danach ist der Verbrauch von Dichlorphenol-indophenol qualitativ deutlich zu erkennen.

Zur quantitativen Bestimmung eignet sich nur die Titration mit n/100 Jodlösung infolge der weit deutlicheren Umschlagsfarbe der Jodstärke. Immerhin ist in den sehr verdünnten Lösungen das Erkennen des Umschlagpunktes sehr von der Einübung und den Beleuchtungsverhältnissen abhängig. Der Vergleich der unmittelbar aufeinanderfolgenden Titrationen einer Versuchsreihe untereinander ist daher wesentlich genauer als der zwischen Bestimmungen, die in einem größeren zeitlichen Abstand und zu verschiedenen Tagesstunden ausgeführt wurden. Die Tabelle V enthält eine Zusammenstellung unserer Titrationsergebnisse. Die n/100 Jodlösung wurde gegen kristallisierte Ascorbinsäure eingestellt. Die verbrauchten Jodmengen sind für die Tabelle in γ-Ascorbinsäure pro E. E. umgerechnet.

Tabelle V. Jodverbrauch von Leberesterasepräparaten.

Nr. des Präparates	1 E. E. besaß die Reduktionswirkung von γ Ascorbinsäure			
	1	2	3	4
Extrakt	3,9	3,9	0,6	10
1. Bleiphosphatvoradsorption	1,0	1,0	0,5	4,0
2. Bleiphosphatvoradsorption	1,0	1,0	0,5	4,8
Elution aus Bleiphosphatadsorption . .		1,0		
Pheron				0,00

4. Tierversuche.

a) Bestimmung der Methylbutyrat- und Tributyrinspaltung in hämolysiertem Hundeblut.

Das Blut wurde dem nüchternen Hund (weiblich, 20 kg schwer, ungefähr 3 Jahre alt) aus einer Hinterbeinvene entnommen, mit der vierfachen

Tabelle VI.
Steigerung der Esterasewirkung im Blut durch Ascorbinsäure.

	Vor dem Ascorbinsäurezusatz	Nach $^1/_2$ Std.	Nach 1 Std.	Nach $1^1/_2$ Std.	Nach 2 Std.	Nach $2^1/_2$ Std.	Nach 3 Std.	Nach 5 Std.
1. Versuch . .	E. E. 0,15	0,07		0,18		0,27		0,18
	B. E. 1,10	0,95		1,00		0,90		1,10
2. Versuch . .	E. E. 0,18	0,16		0,24		0,16		
	B. E. 1,05	1,05		0,95		0,75		
3. Versuch . .	E. E. 0,13		0,14		0,18		0,18	
	B. E. 1,15		1,00		0,95		0,95	

Menge Wasser verdünnt und nach 10 Minuten abzentrifugiert. Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß die Schwankungen innerhalb eines Tages für unsere Vergleiche unerheblich sind, spritzten wir morgens 400 bis 500 mg Ascorbinsäure, in 4 bis 5 ccm Wasser gelöst, intravenös ein und bestimmten fortlaufend das Spaltungsvermögen des Blutes (s. Tabelle VI).

b) Bestimmung von Methylbutyrat- und Tributyrinspaltung mit Leber und Pankreas von normalen und von mit Ascorbinsäure vorbehandelten Meerschweinchen.

Es wurden 13 weibliche Meerschweinchen ungefähr desselben Alters und Gewichts (250 bis 300 g) bei derselben Lebensweise gehalten. Sie wurden

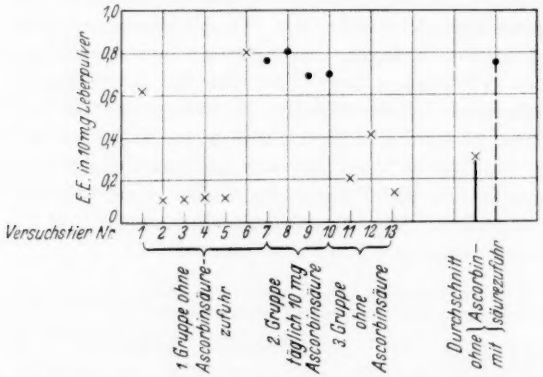


Abb. 1. Zuwachs an Esterase in Meerschweinchenleber durch Ascorbinsäurezufuhr.

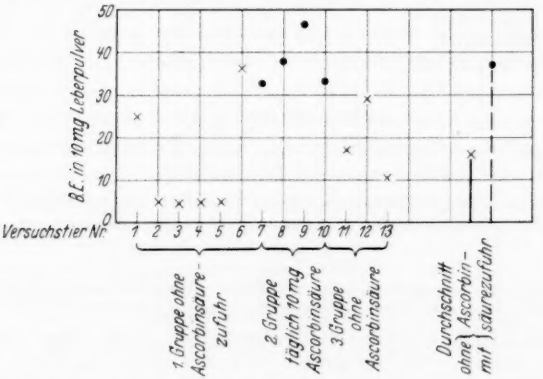


Abb. 2. Zuwachs an Lipase in Meerschweinchenleber durch Ascorbinsäurezufuhr.

in drei Gruppen eingeteilt. Die vier Tiere der zweiten Gruppe erhielten 10 Tage lang täglich 10 mg Ascorbinsäure, in 1 ccm Wasser gelöst, intraperitoneal eingespritzt. Die erste Gruppe (fünf Tiere) wurde bei Beginn des

Versuchs durch Nackenschlag getötet, Leber und Pankreas wurden entnommen und nach Zerkleinerung mit einem Latapieapparat durch Aceton und Äther getrocknet. Die Lebern aller Tiere wurden einzeln aufgearbeitet, während die Pankreasmenge dafür zu klein erschien. Wir vereinigten daher jedesmal das Pankreas aller Tiere einer Gruppe. Am 11. Tage wurden die Tiere der zweiten mit Ascorbinsäure behandelten und die der unbehandelten dritten Gruppe getötet und ihre Organe aufgearbeitet. Aus den sorgfältig zerkleinerten Trockenpulvern wurden zur Bestimmung der Methylbutyrat- und der Tributyrinspaltung je 10 mg direkt im Versuchsansatz verwendet.

Die Abb. 1 enthält die in 10 mg Leberpulver gefundenen E. E., Abb. 2 die entsprechenden B. E. Die Steigerung durch die Ascorbinsäure ist trotz der geringen Zahl der Versuchstiere einwandfrei festzustellen.

In 10 mg Pankreastrockenpulver sowohl der unbehandelten wie der mit Ascorbinsäure behandelten Meerschweinchen wurden 6 B. E. gefunden. Im Pankreas trat also keine Zunahme des Lipasesymplexes ein.

Zusammenfassung.

Präparate der Leberesterase besitzen das starke Reduktionsvermögen der Ascorbinsäure. In pheronreichen Präparaten und mit Esterasepheron selbst ruft Ascorbinsäure Esterasewirkung hervor. Ebenso wird der Esterasegehalt von Blut und Leber durch Zufuhr von Ascorbinsäure beim lebenden Tier erhöht. Da die zur Reaktivierung von Pheron notwendigen Ascorbinsäuremengen die in Esterasepräparaten nachweisbaren weit übertreffen, ist anzunehmen, daß die Ascorbinsäure zwar nicht direkt, wohl aber nach einer Umwandlung mit dem Pheron der Esterase zu Esterasesymplex zusammentritt.

Über die physiologischen Schwankungen des Blutzuckerspiegels bei Kaninchen und Hunden.

Von

S. G. Geness und **W. P. Komissarenko.**

(Aus dem Charkower Medizinischen Institut, Lehrstuhl der Pathologischen Physiologie und dem Ukrainischen Institut für Endokrinologie und Organotherapie, Abteilung für Pathologische Physiologie.)

(Eingegangen am 13. Februar 1936.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Im Verlauf der Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Präparate auf den Blutzuckerspiegel fanden wir bei normalen Kaninchen wiederholt Werte, die von den in der Literatur angenommenen Durchschnittswerten stark abweichen. Zahlreiche Verfasser berichten ebenfalls von solchen Schwankungen, jedoch ohne diese Angaben einer systematischen Bearbeitung zu unterwerfen. Wir stellten uns daher die Aufgabe, mit Hilfe unseres eigenen Materials sowie des in der Fachliteratur erwähnten die Häufigkeit des Auftretens solcher Schwankungen zu ermitteln und festzustellen, wie weit diesen bei Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Faktoren auf den Blutzuckerspiegel Rechnung zu tragen ist. Unser Laboratorium verfügt über ein größeres Material über den Nüchternblutzuckerspiegel bei Kaninchen und Hunden. Dies ermöglicht den Vergleich der Befunde bei beiden Tierarten.

Unser Ziel war die Feststellung der Schwankungsbreite des Blutzuckerspiegels (BZ.-Spiegels) unter folgenden Gesichtspunkten:

A. Bei nüchternen Tieren.
   1. Bei verschiedenen Kaninchen und Hunden (Norm für die Art).
   2. Bei ein und demselben Tier im Laufe einer längeren Zeitspanne (individuelle Norm).
   3. Bei ein und demselben Tier im Laufe des Tages.

B. Nach Glucosebelastung.
   4. Bei verschiedenen Kaninchen und Hunden.
   5. Bei ein und demselben Tier durch wiederholte Untersuchungen im Laufe von 3 Monaten.

Es wurden Tiere von annähernd gleichem Gewicht verwendet (Kaninchen 2 bis $2^1/_2$ kg, Hunde 7 bis 14 kg). Während der ganzen Versuchszeit erhielten alle die gleiche Kost in gleichen Mengen. Mit Rücksicht darauf, daß (wie es die Beobachtungen von *Bang* (1) und *Staub* (2) zeigten) die Dauer des Hungerns Blutzuckerspiegel und Charakter der Blutzuckerkurve wesentlich beeinflußt und daß die höchste Kohlenhydrattoleranz bei 10- bis 15stündigem Hungern der Tiere besteht, führten wir unsere Untersuchungen

stets 16 bis 18 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme aus. Es wurde auch darauf geachtet, daß das Tier vor und während des Experiments sich in voller Ruhe befand.

Psychische und sexuelle Erregung wurde bei den Tieren streng vermieden, da sie bekanntlich Hyperglykämie und Glykosurie hervorrufen kann. Die Tiere wurden daher stets in demselben Raum belassen, und zwar in eisernen Käfigen (da nach den Beobachtungen von *Schenk* (3) bei Kaninchen in hölzernen Käfigen der Blutzuckerspiegel schon darum Schwankungen unterworfen ist, weil die Tiere an dem Holz nagen); Pflege und Blutentnahme wurden während der ganzen Versuchszeit von den gleichen Personen und unter gleichbleibenden Bedingungen besorgt. Die Blutzuckermenge wurde nach *Hagedorn-Jensen* in zwei Parallelproben bestimmt.

1. Blutzuckerschwankungen nüchtern bei verschiedenen Kaninchen und Hunden (Norm für die Art).

Der Blutzuckerspiegel wurde bei 510 Kaninchen untersucht (Abb. 1). Wie aus der Abb. ersichtlich, schwankte er bei 69% der Tiere zwischen 91 bis 120 mg-%, bei 19% der Tiere zwischen 121 bis 160 mg-% und bei 12% der Tiere lag er unterhalb 90 mg-%. Unsere Befunde decken sich mit den in der Literatur angegebenen[1]. Der BZ.-Spiegel schwankt somit bei Kaninchen in den weiten Grenzen zwischen 60 und 160 mg-%. Der Durchschnittswert für den Blutzuckerspiegel aus unseren Befunden und denen anderer Verfasser, insgesamt für 1020 Kaninchen, ergibt sich zu $M = 108$ bei $\sigma = \pm 17$. (Für unsere Versuche mit 510 Kaninchen $M = 108$ bei $\sigma = \pm 16$, für Versuche anderer Forscher ebenfalls für 510 Kaninchen $M = 109$ bei $\sigma = \pm 18$.)

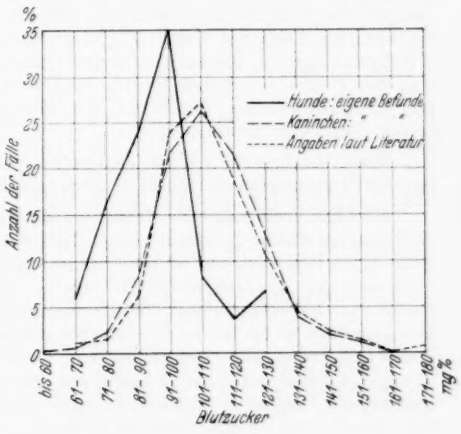


Abb. 1.

Die individuellen Blutzuckerschwankungen bei den Kaninchen erinnern an diejenigen bei Vögeln. *Bang* (1) gibt sie (für vier Arten) mit 150 bis 270 mg-% an. *Bierry* und *Faudard* (14) erwähnen etwas geringere Schwankungen: 180 bis 240 mg-%. *Scott* und *Honeywell* (15) fanden bei Tauben besonders große Schwankungsbreite: 160 bis 340 mg-%.

Abb. 1 enthält ferner unsere Untersuchungsergebnisse an 100 Hunden und zeigt, daß die Schwankungen des BZ.-Spiegels bei

[1] Vgl. Literaturverzeichnis Nr. 4 bis 13.

Hunden hinter denen der Kaninchen weit zurückstehen. Vergleicht man die individuellen BZ.-Schwankungen bei 100 Hunden nicht mit denen von 510 Kaninchen, wie in Abb. I, sondern mit solchen bei 100 wahllos herausgegriffenen Kaninchen[1], so findet man die Stabilität des Blutzuckerspiegels bei Hunden viel schärfer ausgedrückt als bei Kaninchen: bei Kaninchen $M = 111$ bei $\sigma = \pm 21$; bei Hunden $M = 92$ bei $\sigma = \pm 14$. Bei der Mehrzahl der Hunde (75%) bewegt sich der BZ.-Spiegel zwischen 71 und 100 mg-%, bei nur 6% zwischen 61 und 70 mg-%, bei 19% zwischen 101 und 130 mg-%. Wenn die unteren BZ.-Werte sich bei Hunden wenig von denen der Kaninchen unterscheiden, so finden sich bei Hunden hohe BZ.-Werte viel seltener. Wir fanden bei unseren Hunden niemals über 130 mg-%, während bei den Kaninchen 130 bis 170 mg-% in 7 bis 8% der Fälle vorkamen.

Die Angaben der einzelnen Autoren über die Blutzuckerwerte bei Hunden sind recht verschieden. So fanden *Bierry* und *Faudard* eine Schwankungsbreite von 100 bis 160 mg-%, nach der Übersicht von *Bang* ist sie jedoch viel bedeutender, nämlich 80 bis 220 mg-%. Durchschnittlich beträgt nach *Allen* und *Wishart* (16) die Blutzuckernorm für Hunde 108 mg-% (70 bis 120 mg-%). Leider sind diese Befunde nicht biometrisch bearbeitet, was den Vergleich mit den unseren erschwert. Ungeachtet der Verschiedenheit der angeführten Werte ist der Blutzuckerspiegel bei Hunden viel stabiler als bei Kaninchen.

Noch beständiger ist der Blutzuckerspiegel bei Pferden, er schwankt nur zwischen 80 und 100 mg-% (*Bierry* und *Faudard*).

Ziemlich stabil sind die Blutzuckerwerte beim Menschen. Aus der von *Rivers* angeführten Tabelle ist ersichtlich, daß die Blutzuckerschwankungen beim Menschen zwischen 63 und 116 mg-% liegen. Nach *Staub* (2) sind sie noch geringer, nämlich 75 bis 113 mg-%. *Ryser* (17) fand auf Grund einer Reihe von Untersuchungen die Durchschnittswerte des Blutzuckers beim Menschen bei 83 bis 92 mg-%, *Noorden* (18) bei 80 bis 90 mg-%, *Gettler* und *Baker* (19) errechneten auf Grund von Untersuchungen von zwölf Autoren 91 mg-%. Leider sind die Angaben der genannten Verfasser ebenfalls nicht biometrisch bearbeitet, darum lassen sie sich mit den oben über Kaninchen und Hunde angeführten Werten schwerlich vergleichen.

2. Blutzuckerschwankungen bei ein und demselben Tier innerhalb einer längeren Zeitperiode.

Untersucht wurde der Blutzucker von acht Kaninchen je einmal in 6 Tagen, der von 27 Kaninchen in unregelmäßigen Zeitabständen.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, schwankt der BZ.-Spiegel des einzelnen Kaninchens innerhalb einer längeren Zeitperiode in weiten Grenzen, wie z. B. bei Kaninchen Nr. 9 zwischen 96 und 129 mg-%, Nr. 13 zwischen 83 und 141 mg-% usw.

[1] Wie aus den Regeln der Variationsstatistik bekannt, je größer die Menge der zur Berechnung verwendeten Fälle, desto geringer das Sigma.

Die durchschnittliche quadratische Abweichung für das einzelne Kaninchen (Sigma) ist sehr bedeutend, so z. B. für Kaninchen

Nr. 9: $M = 111$; $\sigma = \pm 10$
„ 10: $M = 112$; $\sigma = \pm 11$
„ 11: $M = 109$; $\sigma = \pm 11{,}6$
„ 12: $M = 109$; $\sigma = \pm 14{,}9$
„ 13: $M = 109$; $\sigma = \pm 16$
„ 14: $M = 109$; $\sigma = \pm 14$
„ 15: $M = 106$; $\sigma = \pm 9$
„ 16: $M = 110$; $\sigma = \pm 9{,}8$

Eine Reihe anderer Kaninchen weist aber bei einer geringeren Zahl von Blutzuckeruntersuchungen ein Sigma von $\pm$ 21, sogar $\pm$ 31 auf. Doch werden solche hohen Werte für σ selten angetroffen.

Bedeutend stabiler ist der BZ. bei einzelnen Hunden in einer längeren Zeitperiode. Obgleich unsere Befunde sich auf kein zahlreiches Material stützen, veranschaulichen sie dennoch diese Stabilität im Vergleich zu der Lage bei den Kaninchen (Abb. 3). Bei Hund

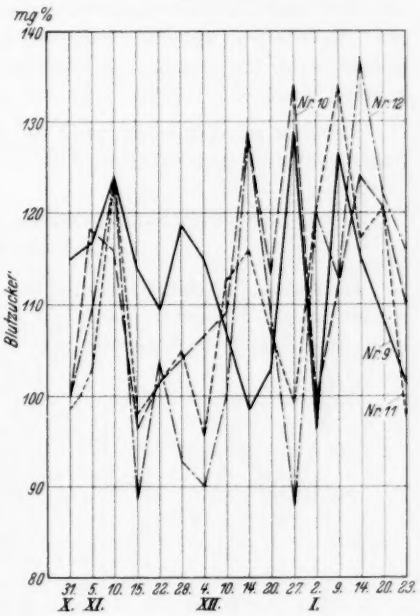


Abb. 2.

Nr. 4: $M = 90$; $\sigma = \pm 10$
„ 5: $M = 64$; $\sigma = \pm 4$
„ 6: $M = 76$; $\sigma = \pm 5$
„ 7: $M = 66$; $\sigma = \pm 4$
„ 8: $M = 96$; $\sigma = \pm 4{,}3$
„ 9: $M = 84$; $\sigma = \pm 5{,}6$

Holtz (23) verfolgte die Blutzuckernorm bei einem Hund im Laufe eines Jahres, bei einem anderen innerhalb von 7 Monaten. Seine Befunde sprechen für weit höhere Schwankungen als die unseren; bei einem Hund fand er sie zwischen 58 und 136 mg-%, bei dem anderen zwischen 48 und 105 mg-%.

M seines Hundes Nr. 6 $= 93$; $\sigma = \pm 16{,}5$

M seines Hundes Nr. 67 $= 91$; $\sigma = \pm 16$

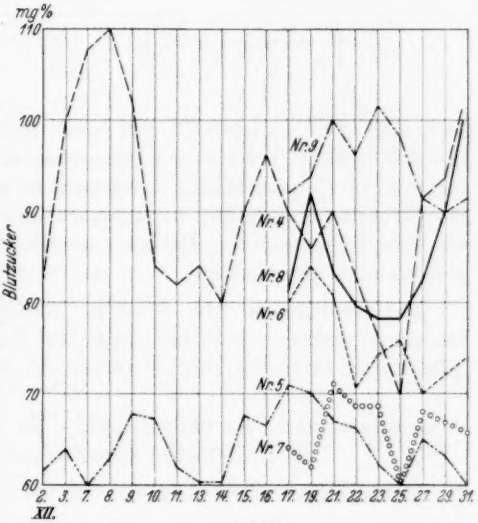


Abb. 3.

Obgleich bei Hunden die BZ.-Schwankungen geringer sind als bei Kaninchen, sind sie dennoch so bedeutend, daß wir in Übereinstimmung mit *Holtz* die Forscher davor warnen möchten, aus Untersuchungen über die Wirkung einzelner Faktoren auf den BZ.-Spiegel Schlüsse zu ziehen, wenn der Versuch an einer geringen Menge von Tieren ausgeführt wurde.

Erwähnt sei, daß es uns noch nicht möglich war, den Einfluß der Jahreszeiten auf den BZ.-Spiegel zu untersuchen.

3. Blutzuckerschwankungen bei ein und demselben Tier im Laufe des Tages.

Im ganzen wurden 32 Kaninchen untersucht. Bei der Mehrzahl weicht der BZ.-Spiegel im Laufe des Tages um $\pm$ 13% vom Ausgangswert ab. Jedoch beobachteten wir neben diesen, den Angaben der Literatur (*Scott, Ford, Eadie, Högler* u. a. m.) nicht widersprechenden Abweichungen Fälle, in denen die Schwankungen $\pm$ 20 bis 30% betrugen. Am Abend sinkt bei der Mehrzahl der Kaninchen die BZ.-Kurve ab. Die Tagesschwankungen des BZ.-Spiegels bei ein und demselben Kaninchen erscheinen bei mehrfachen Untersuchungen bei weitem nicht gleichartig. In Abb. 4 ist die ganz unregelmäßig verlaufende Kurve von Kaninchen Nr. 20 als Beispiel dargestellt. Bei anderen Tieren wiederum verläuft sie einigermaßen gleichmäßig.

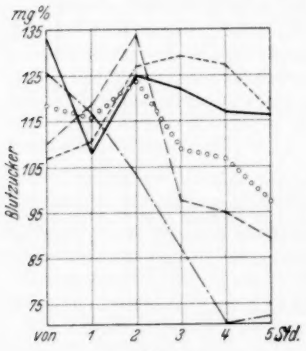


Abb. 4.

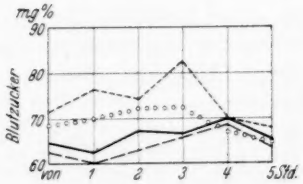


Abb. 5.

Bei den Hunden (Abb. 5) ist der BZ.-Spiegel im Laufe des Tages bedeutend stabiler. Auch bei mehrfacher Untersuchung erscheint das Tagesniveau ziemlich stabil, oft decken sich die Werte fast.

4. Schwankungen der Blutzuckerkurve bei Kaninchen und Hunden während Glucosebelastung.

Bei acht Kaninchen wurde der BZ.-Spiegel innerhalb von mehreren Stunden nach Darreichung von 4 g konzentrierter Glucoselösung

untersucht (dreimal mit einstündigem Abstand), und zwar alle 5 Tage im Laufe von 3 Monaten.

Unsere Kaninchen erhielten die Glucose stets in der gleichen Konzentration, da nach *Böe* (20) unter sonst gleichen Bedingungen die Hyperglykämie um so größer ist, je konzentrierter die angewandte Lösung war. Die 1%ige Glucoselösung bewirkte in den Versuchen von *Böe* überhaupt keine Hyperglykämie.

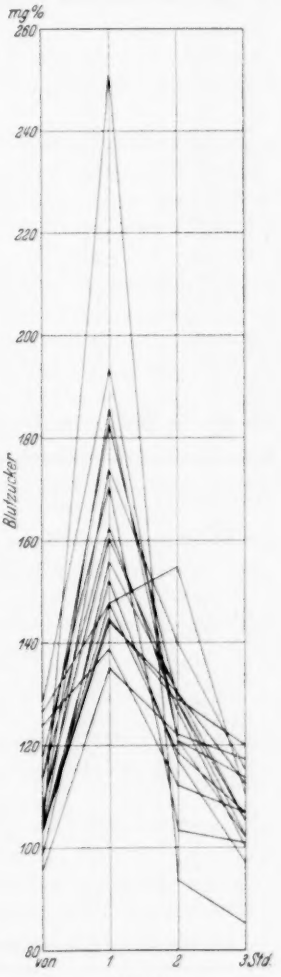


Abb. 6.

Grad und Dauer der Hyperglykämie hängen nicht nur von Konzentration und Menge der Glucose ab (vgl. *Staub*), sondern auch von der Art der Darreichung. So ist die BZ.-Kurve bei intravenöser Injektion der bei peroraler Einführung ähnlich, doch tritt hier der Kulminationspunkt früher ein. Bei rektaler Einführung (*Robino* und *Varella*) tritt geringe Hyperglykämie, jedoch ausgesprochene Glykosurie ein. Wir führten Glucose stets per os ein. Die Dauer der Einführung der Glucose in unseren Versuchen war einigermaßen gleichmäßig (12 bis 15 Sekunden). Bekanntlich führt langsame Einführung zu länger währender Hyperglykämie als die rasche (*Albriton*). Aus Tabelle I, II und Abb. 6 ist zu ersehen, daß die BZ.-Kurve bei Kaninchen in der Mehrzahl der Fälle ihren Höchststand 1 Stunde nach Belastung mit 4 g Glucose erreicht, nach 2 Stunden stark fällt und nach 3 Stunden sich oft der Norm nähert oder sogar unter den Ausgangswert fällt. Der qualitative Charakter der Kurven ist annähernd der gleiche bei jedem Kaninchen im mehrfach wiederholten Versuch; quantitativ aber ist die Stärke der alimentären Hyperglykämie unter streng vergleichbaren Bedingungen verschieden, sowohl bei verschiedenen Kaninchen wie auch beim Einzeltier im mehrfach wiederholten Versuch[1].

[1] Vgl. die übereinstimmende Beobachtung von *Högler* (13).

Tabelle I. Wirkung von 4 g Glucose per os auf den Blutzucker des Kaninchens Nr. 5.

Datum der Untersuchung 1933	Blutzucker vor dem Versuch in mg-%	Blutzucker nach Glucose per os			Anstieg in %
		nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 3 Std.	
4. XI.	117	184	127	113	57,2
9. XI.	101	171	127	99	69,3
14. XI.	108	147	126	113	36,1
17. XI.	118	174	160	91	47,4
23. XI.	83	181	107	108	118,0
26. XI.	103	145	105	99	40,8
3. XII.	113	147	104	114	30,1
9. XII.	117	133	122	116	13,7
13. XII.	131	192	141	118	46,5
19. XII.	114	154	131	74	35,1
26. XII.	94	142	119	86	51,0
1934					
3. I.	141	178	134	126	26,2
8. I.	117	168	124	96	43,5
13. I.	107	153	123	113	43,0
19. I.	79	138	86	81	74,7
25. I.	97	129	—	75	33,0 48

Tabelle II. Wirkung von 4 g Glucose per os auf den Blutzucker des Kaninchens Nr. 4.

Datum der Untersuchung 1933	Blutzucker vor dem Versuch in mg-%	Blutzucker nach Glucose per os			Anstieg in %
		nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 3 Std.	
31. X.	100	189	102	104	89
5. XI.	109	173	175	131	60,5
10. XI.	123	194	96	83	57,7
15. XI.	89	99	—	89	11,2
27. XI.	104	161	100	94	54,8
28. XI.	93	139	107	102	49,4
4. XII.	90	149	132	97	65,5
10. XII.	100	146	70	97	46
14. XII.	127	149	120	111	17,3
20. XII.	112	143	96	82	27,6
27. XII.	87	136	116	121	56,3
1934					
2. I.	120	154	123	117	28,3
9. I.	113	162	126	84	44,2
14. I.	137	166	127	114	21,2
20. I.	122	177	134	112	45
23. I.	116	50	116	78	29,3 44

Aus folgender Zusammenstellung werden die Unterschiede ersichtlich:

Kaninchen Nr.	Minimum %	Maximum %	Kaninchen Nr.	Minimum %	Maximum %
1	16,5	141,8	6	6,3	106,1
2	16,6	82,8	7	31,3	87,5
3	21,7	89,3	8	14,5	65,0
5	13,7	118,0			

Im Durchschnitt schwankt aber der maximale Aufstieg der hyperglykämischen Kurve bei unseren acht Kaninchen in relativ engen Grenzen, d. h. um 41 bis 51 %: das arithmetische Mittel aus 128 Untersuchungen beträgt bei acht Kaninchen $M = 47$, $\sigma = \pm 3{,}6$.

Es soll auch noch folgende Regelmäßigkeit erwähnt werden, die wir in einer großen Anzahl unserer Versuche mit Glucosebelastung beobachteten: Je tiefer der BZ.-Spiegel vor Belastung, desto höher die Kurve nach Belastung, was das von *Wilder* (22) gefundene Gesetz über die Ausgangswerte bestätigt.

Die oben angeführten Befunde charakterisieren das Kaninchen in bezug auf seinen Kohlenhydratstoffwechsel als ein äußerst labiles Tier. Sein BZ.-Spiegel wird von zahlreichen, oft mit den uns heute zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden nicht feststellbaren Faktoren beeinflußt.

Besonders klar zum Ausdruck kommt die Verschiedenheit der BZ.-Reaktion bei Einwirkung der gleichen Reizmittel. So verursachte die gleiche Dosis (pro 1 kg Gewicht) Pyramidon oder schwefelsaures Magnesium oder Adrenalin bei wiederholter Einführung, sogar bei ein und demselben Kaninchen, um so mehr bei verschiedenen Kaninchen, einen ganz verschiedenen Grad von Hyperglykämie, wie dies durch zahlreiche Arbeiten von *Högler* (12) veranschaulicht wird. Dasselbe tritt ein bei kombinierter Einführung von Pyramidon und Insulin, Chloralhydrat und Atropin usw.

Wenn der BZ.-Spiegel im entscheidenden Maße vom vegetativen System (im Sinne von *Kraus-Zondeck*) abhängig ist (vgl. die Untersuchungen von *Pollak*, *Högler* u. a.), dann muß dieses System beim Kaninchen äußerst labil, beim Hund bedeutend stabiler sein (mindestens in Hinsicht auf den Kohlenhydratstoffwechsel).

Zusammenfassung.

Der normale, an 1020 Tieren festgestellte Nüchternblutzuckerspiegel bei Kaninchen schwankt in breiten Grenzen zwischen 60 und 160 mg-% ($M = 108$, $\sigma = \pm 17$).

Der BZ.-Spiegel bei Hunden ist stabiler als bei Kaninchen, seine Schwankungen liegen zwischen 60 und 130 mg-% ($M = 92$, $\sigma = \pm 14$). Vergleicht man diese Werte, die aus Versuchen an 100 Hunden erhalten worden sind, mit den Werten für dieselbe Anzahl Kaninchen, so tritt die Stabilität des BZ.-Spiegels bei den Hunden noch schärfer zutage (M bei 100 Kaninchen $= 111$, $\sigma = \pm 21$).

Der BZ.-Spiegel bei Kaninchen schwankt in weitem Maße sowohl innerhalb eines Tages als auch, ganz besonders, im Verlauf von Monaten. Bei Hunden sind diese zeitlichen Schwankungen geringer.

Die alimentäre Hyperglykämie ist in wiederholten Versuchen bei demselben Kaninchen bedeutenden Schwankungen unterworfen, doch

scheint der Durchschnittsanstieg der hyperglykämischen Kurven bei verschiedenen Versuchstieren ziemlich gleichartig zu sein.

Der durchschnittliche Anstieg der BZ.-Kurve nach peroraler Einführung von Glucose schwankte bei acht Kaninchen, die 128mal untersucht wurden, zwischen 41 und 51 mg-% bei $M = 47$, $\sigma = \pm 3{,}6$.

Literatur.

1) *I. Bang*, Der Blutzucker 1913. — 2) *H. Staub*, Zeitschr. f. klin. Med. **91**, 44, 1921; **93**, 123, 1922. — 3) *Schenk*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **167**, H. 2. — 4) *F. Silberstein*, *I. Freund* u. *T. Révész*, diese Zeitschr. **181**, 316, 1927. — 5) *E. Glaser* u. *G. Halpern*, ebenda **207**, 377, 1929. — 6) *W. Oppel*, ebenda **205**, 31, 47, 1929. — 7) *H. Wulf*, ebenda **214**, 382, 1929. — 8) *L. Asher*, ebenda **163**, 95, 1925. — 9) *Lipmann* u. *Planelles*, ebenda **163**, 406, 1925. — 10) *P. Botschkareff* u. *Grigorieff*, ebenda **215**, 493, 1929. — 11) *A. M. Utewsky*, *S. Epstein* u. *F. Peskina*, Vratschebnoje Delo, Nr. 12. — 12) *F. Högler*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med., Sonderdruck **84**, H. 1/2; **86**, H. 1/2, 1933. — 13) *F. Högler*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. S. 325—342. — 14) *H. Bierry* u. *Faudard*. C. r. hebdom. d. Séances de l'Acad. Sciences **156**, 2011, 1918. — 15) *E. Scott* u. *Honeywell*, Amer. J. of Physiol. **55**, 362, 1921. — 16) *F. N. Allen* u. *M. Wishart*, J. of biol. Chem. **43**, 129, 1920. — 17) *Ryser*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **18**, 441, 1916. — 18) *Noorden*, Die Zuckerkrankheit, 7. Aufl., 1917. — 19) *Gettler* u. *Baker*, J. of biol. Chem. **25**, 151, 1916. — 20) *Böe*, diese Zeitschr. **58**, 106, 1914. — 21) *Derselbe*, ebenda **64**, 450, 1914. — 22) *Wilder*, Klin. Wochenschr. Nr. 48, 1931. — 23) *Holtz*, diese Zeitschr. **235**, 104, 1931.

Zur Spezifität der Glykosidasen.

Von

E. Hofmann.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 30. März 1936.)

I. Allgemeines.

Seitdem die strenge, durch das geläufige Bild von Schloß und Schlüssel zum Ausdruck gebrachte Spezifität der Fermente durch *E. Fischer*[1] erkannt worden war, ist die Frage nach den Grenzen dieser Spezifität immer offengeblieben. Mit Zunahme der enzymatischen Spaltungen zugänglichen Substrate wuchs die Zahl der entsprechenden Enzyme. Besonders war dies der Fall, als die fermentative Hydrolyse der vielen natürlichen und synthetischen Glykoside, ferner der gepaarten Glucuronsäuren[2] sowie der Peptide und Proteine eingehender studiert wurde. Selbstverständlich wäre es möglich, durch Isolierung der einzelnen spezifischen Fermente eine vollkommene Klärung zu treffen und unnötige Spezifizierung zu verhindern; sie ist jedoch bis heute noch nicht gelungen, obwohl zahlreiche Untersuchungen diesem Ziele gewidmet wurden.

Die Annahme trifft aber nicht zu, daß man in der Vergangenheit für jedes Substrat ein entsprechendes Enzym gefordert und so die Zahl der spezifischen Fermente ins Uferlose vermehrt hätte. Im Gegenteil hat es nie an Versuchen gefehlt, für das Verhalten bestimmter Gruppen verwandter Substrate gegen Enzyme die Wirkung eines einzigen Ferments verantwortlich zu machen. So hat aus der Tatsache, daß untergärige Hefe nicht allein α-Glucoside, sondern auch Maltose angreift, schon *E. Fischer* (l. c.) auf Identität von Maltase und α-Methylglucosidase geschlossen; ebenso hat er eine Verschiedenheit zwischen Hefe- und tierischer Maltase abgelehnt, obwohl beide Enzyme sich gegen α-Methyl-glucosid sehr ungleich verhalten. Sogar die damals bekannten fermentativen Hydrolysen durch Emulsin scheint er zunächst auf ein einziges darin enthaltenes Enzym zurückgeführt zu haben.

Auch auf die verschiedenen, von *R. Willstätter* und Mitarbeitern ausgeführten Untersuchungen über die einheitliche Natur aller im Emulsin enthaltenen β-Glucosidasen[3], über die Identität von Maltase und

[1] *E. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 60, 1898; **107**, 176, 1919; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 2985, 3479, 1894. — [2] *C. Neuberg* u. *W. Neimann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 125, 1905. — [3] *R. Willstätter*, *R. Kuhn* u. *H. Sobotka*, ebenda **129**, 33, 1923.

α-Methyl-glucosidase[1] sowie über die Hydrolyse von Raffinose und Rohrzucker[2] durch das Invertin der Hefe muß hingewiesen werden.

Seit mehreren Jahren wurden nun Theorien und Arbeitshypothesen aufgestellt, die in der Tat eine große Vereinfachung im System der Carbohydrasen bedeuten würden, wenn sie mit den experimentellen Befunden zu vereinbaren wären. Dabei ist zuzugeben, daß die wirklichen Verhältnisse in der Natur oft einfacher liegen als angenommen wird, solange sie nicht klar erkannt sind. Andererseits muß aber auch daran erinnert werden, daß der Natur beim Aufbau lebenswichtiger Stoffe, wie z. B. der Eiweißkörper, unbegrenzte Möglichkeiten der Kombination und Variation zur Verfügung stehen, und wir uns recht gut vorstellen können, daß für die Zerlegung gleicher Substrate bei den verschiedenen Organismen auch verschiedene Fermente existieren.

Eine solche Theorie hat *R. Weidenhagen*[3] aufgestellt. Nach ihr kann man grundsätzlich nicht von Enzymen sprechen, die singulärspezifisch auf bestimmte Glykoside, Di- oder Tri-saccharide eingestellt sind. Es gibt nur Glykosidasen, deren Hauptspezifität an die Konstitution und Konfiguration des glykosidisch verknüpften Zuckers gebunden ist. Insbesondere hat die Natur des anderen Paarlings nur sekundäre Wirkungen, vor allem in quantitativer Hinsicht.

Noch weiter ging *B. Helferich* in seinen Berichten über Versuche mit dem Emulsin der Mandeln, doch sollten die dort geäußerten Ideen nur als eine Arbeitshypothese gewertet werden. Erst mußte man annehmen, daß er einem einzigen Ferment im Emulsin nicht nur die Spaltung der verschiedenen β-, sondern auch die der α-Glykoside zuschreiben wolle. Aber schon in einer Nachschrift zu der betreffenden Veröffentlichung[4] hat *Helferich* diese Ansicht wieder zurückgezogen. Für die Hydrolyse der β-Glucoside, der β-Galaktoside, der α-Mannoside u. a. sollte jedoch die Annahme eines einzigen Enzyms ausreichend sein. Bald mußte er dann zugeben, daß auch für die Spaltung der α-Mannoside[5] ein besonderes Enzym anzunehmen sei, und was die fermentative Hydrolyse der β-Glucoside, β-Glucuronide und β-Galaktoside betrifft, so lassen seine letzten Beobachtungen alle Möglichkeiten offen[6].

In der Literatur finden sich Angaben über das Vorkommen von α- und β-Glykosidasen bei den verschiedensten Organismen. Wie aber

---

[1] *R. Willstätter* u. *W. Steibelt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **115**, 199, 1921; *R. Willstätter, R. Kuhn* u. *H. Sobotka*, ebenda **134**, 224, 1924. — [2] *R. Kuhn*, ebenda **125**, 28, 1923. — [3] *R. Weidenhagen*, Naturwiss. **16**, 654, 1928; Zeitschr. f. angew. Chem. **42**, 833, 1929. — [4] *B. Helferich* u. *H. Appel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **205**, 231, 1932; *B. Helferich, S. Winkler, R. Lootz, O. Peters* u. *E. Günther*, ebenda **208**, 91, 1932. — [5] *B. Helferich, H. Heyne* u. *R. Gootz*, ebenda **214**, 139, 1933. — [6] *B. Helferich* u. *G. Sparmberg*, ebenda **221**, 92, 1933; *B. Helferich* u. *S. Winkler*, ebenda **221**, 98, 1933.

schon vor einiger Zeit dargelegt wurde[1], handelt es sich vielfach nur um veraltete und oberflächliche Beobachtungen. Fast alle ausführlicheren Untersuchungen über Glykoside und Disaccharide spaltende Fermente sind an Präparaten aus einigen wenigen Organismen ausgeführt worden, als welche wohl aus praktischen Gründen immer wieder unter- bzw. obergärige Hefe, das Emulsin der Mandeln, sowie der Aprikosen, die Taka-Diastase, Malzpräparate und einige wenige andere benutzt wurden.

Aus diesem Grunde haben wir uns seit Jahren mit der Untersuchung von *Enzympräparaten verschiedenen Ursprungs* befaßt, um auf diese Weise nicht nur zur Erforschung der Physiologie und Systematik der Organismen beizutragen, sondern auch um für die Erkennung der Spezifität der Fermente neue Unterlagen zu erhalten.

Es war nicht unsere Absicht, Theorien aufzustellen oder zu widerlegen. Wir haben angenommen, daß die von uns und — wie die Literatur ergibt — auch von anderen Autoren erzielten experimentellen Ergebnisse wertvoller sind als Ansichten, die sich damit nicht vereinbaren lassen. Da wir jedoch neuerdings wahrnehmen, wie unsere Beobachtungen jener Theorien wegen ausgelegt werden, müssen wir im folgenden auf die wichtigsten dieser Befunde eingehen, zugleich aber sei über neue Untersuchungen mit Fermentpräparaten aus Leber, Niere und Darmschleimhaut verschiedener Tiere berichtet, die unsere früheren Befunde ergänzen[2].

Nach *Weidenhagen* gibt es keine besonderen Fermente, die Disaccharide spalten, also auch keine Lactase, keine Maltase und keine Saccharase. Das erstgenannte Enzym ist identisch mit der β-Galaktosidase, die Maltase mit der α-Glucosidase, während der Rohrzucker entsprechend seiner Struktur sowohl durch die β-am-Fructosidase als auch durch die α-n-Glucosidase zerlegt werden muß. Infolgedessen kann auch die in der Literatur beschriebene Existenz zweier Lactasen, einer Gluco-Lactase und einer Galakto-Lactase nicht richtig sein, ebenso wie die zweier Maltasen[3]. Nun beruht die Annahme zweier Lactasen auf der Beobachtung, daß die Hydrolyse des Milchzuckers mittels Emulsins durch Glucose, die vom Enzym der Milchzuckerhefen bewirkte durch Galaktose gehemmt wird[4]. Wir haben diese Befunde bestätigen können[5], und uns ist nicht bekannt, daß sie von anderer Seite widerlegt worden wären.

---

[1] *E. Hofmann*, diese Zeitschr. **272**, 426, 1934. — [2] *C. Neuberg* u. *E. Hofmann*, ebenda **281**, 431, 1935; *E. Hofmann*, ebenda **281**, 438, 1935. — [3] *R. Weidenhagen* in E. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. IV, Teil 2, S. 2063, 2086, 1933. — [4] *H. E. Armstrong*, *E. F. Armstrong* u. *E. Horton*, Proc. Roy. Soc. London [Ser. B] **80**, 321, 1908. — [5] *E. Hofmann*, diese Zeitschr. **256**, 462, 1932.

Für die Annahme einer Identität von β-Glucosidase und β-Galaktosidase spricht nach *B. Helferich* das gleiche Verhältnis der Wirksamkeit verschiedener gereinigter Mandel-Emulsinpräparate auf die entsprechenden β-Glykoside.

Nachdem wir nun gezeigt hatten[1], daß bei den Milchzuckerhefen und vielen anderen Fermentpräparaten Verhältnisse vorliegen, die ganz verschieden sind von denjenigen, die im Emulsin beobachtet wurden, und daß mehrfach nur β-Galaktosidasewirkung nachzuweisen ist, hat im Laboratorium von *Helferich K. Hill* die gleiche Beobachtung am Emulsin der Luzernesamen gemacht[2].

Um nun trotz dieser Befunde die Identität der beiden β-Glykosidasen beim Emulsin nicht ausschließen zu müssen, sowie aus einem anderen Grunde, auf den weiter unten zurückzukommen sein wird, nimmt *Helferich*[3] verschiedene β-Galaktosidasen im Mandel-Emulsin einerseits und im Luzernesamen andererseits an; er schlägt zugleich vor, diese Betrachtungsweise auch auf die anderen Glykosidasen zu übertragen.

Man wird zugeben müssen, daß nun an die Stelle einer verhältnismäßig kleinen Anzahl bisher angenommener spezifischer Carbohydrasen zahllose besondere Glykosidasen getreten sind, entsprechend dem Artenreichtum der belebten Welt. Es ist selbstverständlich nichts dagegen einzuwenden, wenn *Helferich* seine Befunde in dieser Weise auslegt: die ursprüngliche Absicht seiner Arbeitshypothese war allerdings eine ganz andere. Erstaunlicher ist es jedoch, wenn nun auch *Weidenhagen* in einer mit *A. Renner*[4] vor kurzem veröffentlichten Abhandlung sich diese, von *Helferich* aufgezeigten Gedankengänge zu eigen macht. Ganz abgesehen davon, daß er die von *K. Hill* am Luzerne-Emulsin beobachteten Verhältnisse für „besonders wichtig" erachtet, obwohl sie 2 bzw. 1 Jahr später veröffentlicht wurden als unsere Abhandlungen und obgleich in den von uns beschriebenen Beispielen die Verhältnisse eindeutiger liegen als beim Präparat aus Luzernesamen, findet er sich nun ohne jeden Einwand mit der Annahme einer unbegrenzten Anzahl verschiedener Galaktosidasen ab, während er die früher postulierten zwei Lactasen — nach seiner Ansicht β-Galaktosidasen — entschieden abgelehnt hat. Ja, darüber hinaus versucht er nun mit ähnlichen Annahmen jene Befunde zu erklären, die der von ihm behaupteten Identität von

---

[1] *C. Neuberg* u. *E. Hofmann*, diese Zeitschr. **256**, 450, 1932; *E. Hofmann*, ebenda **256**, 462, 1932; **267**, 309, 1933; **272**, 426, 1934. — [2] *K. Hill*, Ber. d. Sächs. Ges. f. Wiss. **86**, 115, 1934; Chem. Centralbl. **1934**, II, 1142. — [3] *B. Helferich* u. *H. Scheiber*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **226**, 272, 1934. — [4] *R. Weidenhagen* u. *A. Renner*, Zeitschr. d. Wirtschgr. Zuckerind. **86**, 22. Januar 1936.

Maltase, Saccharase und α-Glucosidase widersprechen. Dieser Ansicht stehen schon alte Beobachtungen von *E. Fischer* und *P. Lindner*[1] an Schizosaccharomyces octosporus und Monilia candida entgegen. Nun haben *H. Karström*, *A. I. Virtanen* und *K. Myrbäck*[2] nachgewiesen, daß Fermentpräparate aus B. coli wohl Maltose, nicht aber Saccharose zerlegen, amerikanische Autoren[3] haben ein gleiches Verhalten an Präparaten anderer Herkunft beobachtet, und wir selbst haben gezeigt, wie man bei frischer Hefe von Schizosaccharomyces octosporus Maltase und Saccharase trennen kann[4]. Aber selbst wenn *Weidenhagen* und *A. Renner* (auf S. 28 der erwähnten Abhandlung) die Existenz verschiedener α-Glykosidasen annehmen, wie *Helferich* verschiedene β-Galaktosidasen, so sind die oben erwähnten Widersprüche gar nicht beseitigt. Denn die beiden β-Galaktosidasen von *Helferich* unterscheiden sich dadurch, daß die eine auch β-Glucoside spalten soll, die andere jedoch nicht. Maltose und Rohrzucker müßten aber nach *Weidenhagen* wegen ihrer gleichen Struktur von jeder α-Glucosidase zerlegt werden. Wohl deshalb erhebt *Weidenhagen* gegen die seiner Ansicht entgegenstehenden Befunde weiter den Einwand der Anomalität. Wäre dieser Einwand berechtigt, so hätte man nicht erst das Vorkommen verschiedener α-Glucosidasen zugestehen müssen. Da die Zahl der Fermentpräparate, die wohl Maltose, aber nicht Rohrzucker zerlegen, inzwischen recht ansehnlich geworden ist, könnte die von *Weidenhagen* vertretene Theorie außerdem nur beschränkt gültig sein. Dieser Einwand ist schließlich ein Argument, das ebensogut auf die von ihm selbst untersuchten Präparate angewandt werden könnte, zumal er die Existenz der Disaccharasen nicht widerlegen, sondern höchstens als überflüssig betrachten kann. *Weidenhagen* und *Renner* berichten über Untersuchungen mit Fermentpräparaten, die Melibiose und α-Galaktoside zerlegen. Wenn sie nun einerseits gefunden haben, daß sowohl Taka-Diastase als auch Malzenzym α-Phenol-galaktosid zerlegen, dagegen nicht oder nur wenig Melibiose, daß aber Essigester-Plasmolysate aus Unterhefe das Disaccharid fast ebenso schnell hydrolysieren wie das Galaktosid, müssen hier die gleichen Einwände wie im Falle der α-Glucosidasewirkung erhoben werden. Insbesondere hebt auch hier die Annahme zahlreicher α-Galaktosidasen die Widersprüche zwischen experimentellem Befund und Einheitstheorie von Melibiase und α-Galaktosidase nicht auf.

---

[1] *E. Fischer* u. *P. Lindner*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **28**, 984, 3034, 1895. — [2] *H. Karström*, diese Zeitschr. **231**, 399, 1931; *A. I. Virtanen*, ebenda **235**, 490, 1931; *K. Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **198**, 196, 1931; **205**, 248, 1932. — [3] *I. M. Neill* u. *E. L. Gaspari*, Chem. Centralbl. **1927**, I, 1325; *H. Tauber* u. *I. S. Kleiner*, ebenda **1933**, II, 557; J. of biol. Chem. **99**, 241, 1932; **105**, 679, 1934; *M. Hotchkiss*, Chem. Centralbl. **1935**, II, 1564. — [4] *E. Hofmann*, diese Zeitschr. **272**, 417, 1934.

Schon vor einigen Jahren haben *W. Grassmann, L. Zechmeister* und Mitarbeiter[1] gezeigt, daß man bei der fermentativen Hydrolyse der höheren, α-konstituierten Poly- und Disaccharide mit der Annahme einer einzigen β-Glucosidase nicht auskommen kann, wie man nach *Weidenhagen* hätte erwarten sollen, ja, daß gewisse Präparate aus Schimmelpilzen wohl Cellobiose, nicht aber das durch andere β-Glucosidasepräparate so leicht hydrolysierbare Salicin zerlegen. Aus den oben beschriebenen Befunden über Maltose-, Saccharose-, Lactose- und Melibiose-spaltung ist zu ersehen, daß auch in diesen Fällen die Annahme einer einzigen, entsprechenden Glykosidase nicht möglich ist.

Man muß infolgedessen fragen, ob es nicht besser ist, auf eine Theorie zu verzichten, die heute in beinahe allen wesentlichen Punkten mit den Versuchsergebnissen in Widerspruch gerät und die durch das nunmehr erfolgte Zugeständnis der Existenz verschiedener, d. h. praktisch fast beliebiger einzelner Glykosidasen ihren ursprünglichen Zweck, nämlich den einer Verringerung der größeren Zahl verschiedener Carbohydrasen auf wenige Glykosidasen, verloren hat, die erwähnten Versuchsergebnisse damit aber gar nicht zu erklären vermag. Das um so mehr, als schon vor Propagierung dieser Ansicht versucht wurde, eine allzu weitgehende Spezifizierung zu vermeiden, soweit es die experimentellen Ergebnisse zuließen. In dem zusammenfassenden Werk von *C. Oppenheimer*, „Die Fermente und ihre Wirkungen“[2], begegnet man in jedem Abschnitt dieser Tendenz. Denn auch der Hinweis auf die Begleitstoffe, den *Weidenhagen* und *Renner* (l. c. S. 26) im Falle der verschiedenen α-Galaktosidasewirkung machen, ist ein unmöglicher Ausweg. Solange wir nicht über reine Carbohydrasen verfügen, und der Begriff des gereinigten bzw. angereicherten Enzympräparates nur ein sehr relativer ist, müssen wir als Ferment das wirksame Prinzip der Präparate betrachten. Man hat einmal die Wirkgruppe als wesentlich für das Ferment angesehen. Inzwischen wurde erkannt, daß der „Träger“ kein nebensächlicher, sondern ein ausschlaggebender Bestandteil ist und Enzyme mit „verschiedenen Trägern“ verschiedene Enzyme sind, und wenn die „Begleitstoffe“ von so wesentlichem Einfluß wären, um Unterschiede in der Wirkung von Enzympräparaten zu verursachen, wie sie *Weidenhagen* bei der Melibiase, der Taka-Diastase und der Hefe und früher[3] schon bei der Cellobiase des Gerstenmalzes und der Mandeln beobachtet hat, so sind das keine Begleitstoffe, sondern wesentliche Bestandteile der Enzyme Melibiase, α-Galaktosidase oder Cellobiase.

---

[1] *W. Grassmann, R. Stadler* u. *R. Bender*, Ann. **502**, 20, 1933; *W. Grassmann, L. Zechmeister, G. Tóth* u. *R. Stadler*, ebenda **503**, 167, 1933. — [2] *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl. Leipzig 1925. — [3] *R. Weidenhagen*, Zeitschr. d. Ver. d. Deutsch. Zuckerind. **80**, 22, 1930.

Helferich[1] hat es ausdrücklich abgelehnt, den Einfluß der Begleitstoffe verantwortlich zu machen für solche Unterschiede in der Wirkung verschiedener Fermentpräparate: „Es würde dann die Gefahr bestehen, daß die ganze Spezifität, d. h. der für die Fermente besonders charakteristische Teil ihrer Wirkung, an den Begleitstoffen hängen bleibt." Und auch nach den von anderer Seite bekanntgewordenen Ansichten kann diesen Stoffen ein solcher Einfluß auf die Wirkung spezifischer Enzyme nicht zugeschrieben werden[2].

II. Die Hydrolyse verschiedener β-Glykoside durch Fermente aus Niere, Leber und Darmschleimhaut.

Im vorstehenden Abschnitt wurde dargelegt, wie schwierig die experimentellen Befunde über die verschiedensten Carbohydrasen mit Theorien und Arbeitshypothesen in Einklang zu bringen sind, welche das Ziel haben, die Zahl der spezifischen Enzyme einzuschränken. Im folgenden wollen wir nun zeigen, wie schwer gerade die Beobachtungen an Glykosidasen tierischer Organe mit den erwähnten Ansichten zu vereinbaren sind. Autolysensäfte und Alkohol-Äther-Trockenpräparate aus frischem Organbrei und aus den bei der Autolyse anfallenden Rückständen von Leber, Niere und Darmschleimhaut zerlegen β-Glucoside und β-Galaktoside. Auch hier ist das Verhältnis der Wirkung auf beide Substratgruppen völlig verschieden von demjenigen im Emulsin sowie auch in verschiedenen anderen Enzympräparaten. Zum Teil ist es so, daß die Galaktoside rascher hydrolysiert werden als die entsprechenden β-Glucoside. *Helferich* und *Sparmberg*[3] haben angegeben, daß Süßmandelemulsin auch Menthol-glucuronsäure zerlegt; Hydrolyse tritt jedoch nur in sehr geringem Umfange ein und ist unvergleichlich (mindestens 100- bis 200mal) schwächer als die Wirkung auf β-Phenolglucosid. Schon vor langer Zeit hat *Neuberg*[4] gezeigt, daß nicht alle gepaarten Glucuronsäuren, sondern vornehmlich die mit aromatischem Paarling von der β-Glucosidase des „Emulsins" und der „Kefirlactase" angegriffen werden. Wir haben beobachtet, daß Fermente aus Leber und Niere β-Naphthol- und auch l-Menthol-glucuronsäure hydrolysieren. Bei der Reinigung von Mandelemulsin nimmt nach *Helferich* und *Sparmberg* (l. c.) die Wirkung auf die gepaarte Glucuronsäure langsamer zu, als diejenige auf β-Glucoside; die Annahme, daß für beide Substrate spezifische Fermente existieren, soll jedoch nach ihrer Ansicht nicht notwendig sein.

---

[1] *B. Helferich* u. *H. Scheiber*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **226**, 272, 1934. — [2] Siehe dazu *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, Supplement **1**, S. 2, Den Haag, 1935. — [3] *B. Helferich* u. *G. Sparmberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **221**, 92, 1933. — [4] *Neuberg*, Ergebn. d. Physiol. **3**, I, 373, 1904.

Unsere Präparate zerlegen gepaarte Glucuronsäuren stark, einzelne Präparate, insbesondere solche aus dem Autolysenrückstand, sogar *rascher* als β-Glucoside. Sie hydrolysieren ferner β-Naphtholglucuronsäure zwei- bis dreimal schneller als die entsprechende Mentholverbindung.

Da *F. Bergmann*[1] für erstere keine Hydrolyse durch Emulsin (*Merck*) feststellen konnte, hat uns der Befund von *Helferich* und *Sparmberg* veranlaßt, beide Substrate gegen Emulsin zu prüfen, und in Bestätigung beider Angaben fanden wir deutliche, wenn auch schwache Hydrolyse bei der Mentholverbindung, keine Spaltung jedoch bei der Naphthol-glucuronsäure. Ob nun letztere durch käufliches Emulsin gar nicht oder nur sehr schwer gespalten wird, auf jeden Fall zerlegen tierische Fermente das β-Naphthol-glucuronid schneller als die l-Menthol-glucuronsäure, und dieses Verhältnis ist beim Emulsin gerade umgekehrt.

Will man also solche Vergleiche heranziehen, um dadurch die Verschiedenheit von Fermenten zu begründen — *Helferich* und *Scheiber*[2] halten die β-Galaktosidasen des Emulsins und der Luzernesamen u. a. deshalb für verschieden, weil Mandelemulsin o-Kresol-β-galaktosid viel leichter zerlegt als das Phenol-β-galaktosid, das Luzerneemulsin jedoch beide Verbindungen mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit —, so kann man daran ermessen, wie groß nun die Zahl besonderer Fermente wird. Es sei nur noch auf ein weiteres Beispiel hingewiesen. Mandelemulsin spaltet Salicin vier- bis sechsmal so schnell als β-Phenolglucosid. Taka-Diastase enthält, wie *Neuberg* und *Rosenthal*[3] sowie *Hatano* schon beobachtet haben, eine sehr aktive β-Glucosidase; sie zerlegt, wie unten gezeigt wird, die beiden vorhin genannten Glucoside mit etwa gleicher Geschwindigkeit; da außerdem die Wirkungen auf β-Glucoside und β-Galaktoside in diesem Präparat eine ganz andere Proportion aufweisen als im Emulsin, so haben wir nach *Helferich* hier schon wieder besondere β-Glykosidasen.

Phlorrhizin wird bei der Hydrolyse mit Alkalien in Phloretinsäure und Phlorin zerlegt[4], welch letzteres mit dem von *E. Fischer* synthetisierten Phloroglucin-β-d-glucosid identisch ist, durch Säuren jedoch in Glucose und in das Aglucon Phloretin. Emulsin spaltet Phlorrhizin nur sehr schwer, so daß an der β-glucosidischen Struktur sogar gezweifelt wurde. Sowohl auf chemischem[5] wie auch auf biochemi-

[1] *F. Bergmann*, diese Zeitschr. **267**, 296, 1933. — [2] *B. Helferich* u. *H. Scheiber*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **226**, 272, 1934. — [3] *C. Neuberg* u. *O. Rosenthal*, diese Zeitschr. **143**, 399, 1923; **145**, 186, 1924; *T. Hatano*, ebenda **151**, 498 u. 501, 1924. — [4] *M. Cremer* u. *R. W. Seuffert*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 2565, 1912. — [5] *F. R. Johnson* u. *A. Robertson*, Chem. Centralbl. **1930**, I, 2788.

schem Wege[1] wurde dieselbe inzwischen sichergestellt. *M. Bridel*[1] erzielte durch Einwirkung von Emulsin in 38 Tagen eine Hydrolyse zu etwa 80 %, das Aglucon wurde kristallisiert erhalten, der Zucker durch Methanol und Emulsin fermentsynthetisch in β-Methylglucosid übergeführt.

Weidenhagen[2] hat die Hydrolyse von Phlorrhizin und Salicin durch Emulsin verglichen und gibt an, daß 1,986 g Salicin durch 50 mg Emulsin in 47 Minuten zu 55 % gespalten wurden; durch die vierfache Menge desselben Enzyms waren erst nach 96 Stunden nur 0,3 g Phlorrhizin zu 57 % zerlegt worden. Es kann also kein Zweifel bestehen, daß Emulsin Phlorrhizin spaltet, allerdings viel hundertmal langsamer als Salicin.

Nach diesen Angaben und unserer Feststellung, daß Niere, Leber und Darmschleimhaut verschiedener Tiere eine kräftig wirksame β-Glucosidase enthalten, erschien uns eine ältere Angabe[3] unverständlich, nach der Phlorrhizin wohl durch Präparate aus der Niere vom Pferd zerlegt wird, nicht aber von solchen aus demselben Organ anderer Tiere.

Wir haben diese Angaben nicht widerlegen können. Autolysensäfte aus Pferdenieren spalten Phlorrhizin vollständig, etwa mit der halben Geschwindigkeit, mit der sie Salicin hydrolysieren. Der mit Alkohol-Äther getrocknete Rückstand der Organautolysate spaltet Salicin und β-Phenolglucosid recht langsam, Phlorrhizin dagegen vollständig und etwa 10- bis 20mal schneller als die beiden erstgenannten β-Glucoside; bei dem aus frischem Nierenbrei gewonnenen Alkohol-Äther-Trockenpräparat ist der Unterschied nicht so groß, aber auch durch ihn wird Phlorrhizin schneller als β-Phenol-glucosid zerlegt. Mit Präparaten aus Pferdeleber sowie mit solchen aus Leber und Niere vom Schwein und vom Rind haben wir trotz starker Spaltung von β-Glucosiden von β-Galaktosiden und β-Glucuroniden keine meßbare Hydrolyse von Phlorrhizin beobachtet. Da letzteres, wie *Weidenhagen* selbst annimmt, ein β-Glucosid ist, wenn ferner nach seiner Theorie eine einzige β-Glucosidase existiert, so bleibt der eben geschilderte Befund unverständlich. Wir haben auch mit Fermentpräparaten aus Dünndarmschleimhaut von Pferd, Rind und Schwein keine Phlorrhizinspaltung beobachten können, trotz deutlicher Hydrolyse von β-Glucosiden.

Dagegen zerlegt Taka-Diastase Phlorrhizin vollständig, wenn auch etwa 20mal langsamer als Salicin. Aus größeren Ansätzen sowohl mit Autolysensaft aus Pferdenieren, als auch aus solchen mit Taka-Diastase, wurde nach vollständiger Hydrolyse das Aglucon Phloretin rein isoliert.

[1] *M. Bridel*, Chem. Centralbl. **1931**, I, 468. — [2] *R. Weidenhagen*, Zeitschr. d. Ver. Deutsch. Zuckerind. **81**, 125, 1931. — [3] *F. Charlier*, Soc. Biol. **53**, 494; siehe *C. Oppenheimer*, Handb. d. Biochem. **5**, 441, Jena 1925.

Es hat denselben Schmelzpunkt wie ein durch Salzsäurehydrolyse gewonnenes Produkt, mit diesem den gleichen Mischschmelzpunkt und stimmt auch in den übrigen Eigenschaften mit ihm überein.

In den Ansätzen mit Ferment und Phlorrhizin tritt Rotfärbung des abgespaltenen und schwer löslichen Phloretins ein, wie das auch schon *M. Bridel* (l. c.) angegeben hat. Es ist aber nicht so, daß diese Färbung etwa die Folge einer primären Oxydasewirkung am Glucosid ist, und daß dann erst Hydrolyse in Glucose und oxydiertes Aglykon erfolgt. Denn nur ein sehr geringer Teil desselben kann, wie die Isolierung des Phloretins zeigt, überhaupt angegriffen sein, die Verfärbung dagegen ist abhängig von der Reaktion der Versuchslösung, sie ist stärker am Neutralpunkt und schwächer im sauren Gebiet, während die Hydrolyse mit Taka-Diastase bei einem p_H von 4,4 bis 4,7 am kräftigsten eintritt; bei dieser Reaktion erfolgt kaum Rotfärbung. Die Hydrolyse wurde durch Bestimmung der frei gewordenen Glucose mit *Fehling*scher Lösung verfolgt, die durch das Aglykon nicht reduziert wird, wie besondere Versuche mit diesem ergeben haben.

III. Wie weit läßt sich auf Grund der experimentellen Ergebnisse die Zahl der spezifischen Carbohydrasen einschränken?

Wenn im ersten Teil dieser Abhandlung Ergebnisse früherer Untersuchungen den neuen Theorien gegenübergestellt wurden, so sei ein Vergleich der im vorstehenden beschriebenen Befunde angeschlossen. Tun wir das im Sinne der von *Helferich* aufgestellten Arbeitshypothese, so ergibt sich zunächst, daß wir beinahe in jedem Präparat anderer Herkunft verschiedene β-Glykosidasen annehmen müssen, und zwar schon dann, wenn wir lediglich die Zerlegung einiger β-Glucoside, β-Galaktoside und Glucuronide betrachten. Berücksichtigen wir aber noch die über die Hydrolyse des Phlorrhizins erhobenen Befunde, so können wir uns nicht mehr erklären, warum ein nach *Weidenhagen* typisches β-Glucosid nicht von typischen β-Glucosidasen gespalten wird, von den Präparaten aus Pferdeniere aber mit größter Leichtigkeit, und zwar je nach der Gewinnung dieser Präparate aus dem gleichen Organ wiederum im verschiedensten Verhältnis, verglichen mit der Zerlegung typischer einfacher β-Glucoside. Mit einem Zugeständnis, wie es *Helferich* bei den verschiedenen β-Galaktosidasen macht, die einmal β-Glucoside mitspalten, im andern Falle jedoch nicht, kommen wir in diesem Falle nicht mehr aus. Wenn oben verlangt wurde, daß einerseits die Theorien über die Einschränkung der Zahl spezifischer Carbohydrasen den experimentellen Ergebnissen entsprechen müssen, andererseits zugegeben wurde, daß es nicht richtig wäre, die Zahl der einzelnen Fermente ins Uferlose zu vermehren, so erhebt sich ohne weiteres die Frage, wieweit läßt sich diese Zahl vermindern. Seit *E. Fischer* ist bei den Carbohydrasen die der räumlichen Anordnung am C-Atom 1 der Monosaccharide entsprechende α-β-Spezifität der Glykosidasen un-

bestritten; ein von *Helferich* unternommener Versuch, sie im Falle des Emulsins als unnötig zu beweisen, mußte von ihm selbst bald wieder aufgegeben werden. Die „Zuckerspezifität" beruht auf der verschiedenen Konstitution und Konfiguration der Monosaccharide. Sie wurde, wie sich aus den von *E. Fischer* über die Hydrolysen durch Emulsin geäußerten Ansichten ergibt, zunächst von ihm selbst nicht streng durchgeführt, im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen und, wie die Literatur ausweist, wohl allgemein angenommen. Die neuerdings von *Helferich* unternommenen Versuche, die Einheit der β-Glykosidasen im Emulsin zu postulieren, waren also nicht neu, wir sehen aber wiederum, daß sie schon jetzt weitgehend gescheitert sind; soweit sie aber aufrechterhalten werden, geschieht dies nur unter gleichzeitiger Annahme verschiedener einzelner Glykosidasen, je nach der Herkunft derselben. Die Ringspezifität ergibt sich aus der Existenz der n- und am-Formen bei den einzelnen Monosacchariden; sie ist eigentlich schon durch die Definition der Zuckerspezifität gegeben. Da *Weidenhagen* gegen die Einschränkungen, die *Helferich* bei der Zuckerspezifität macht, nichts einzuwenden hat, sondern sie vielmehr zu akzeptieren scheint[1], wären also nur noch zwei Spezifitäten als absolut zu betrachten. Insbesondere aber ist die Natur des Aglykons nach seiner Ansicht gleichgültig und nur auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Einfluß.

Um hier Einwände verständlicher zu machen, ist es gut, einen Blick auf verwandte Zweige der Fermentchemie zu werfen, z. B. auf das Gebiet der Sulfatasen oder der Phosphatasen. Die sauren Ester der Schwefelsäure sind zahlenmäßig geringer, weil hier im Gegensatz zu der bei den Glykosiden, Di- und Polysacchariden möglichen Verschiedenheit aller Komponenten nur jeweils ein Anteil variiert, der dort dem Aglykon entspricht. Die von *C. Neuberg* und Mitarbeitern[2] erfolgte Untersuchung der entsprechenden Fermente hat hier zweifellos ergeben, daß entsprechend der Natur des mit der Schwefelsäure verbundenen Alkohols, Zuckers, Phenols usw. mindestens schon drei verschiedene spezifische Sulfatasen erforderlich sind.

Eine Reihe von Angaben in der Literatur, z. B. den Befund von *H. Pringsheim* und *J. Leibowitz*[3], daß die Maltase des Gerstenmalzes und verschiedener Schimmelpilze u. a. wohl Maltose, aber nicht α-Methylglucosid zerlegt, und die daraus gezogene Schlußfolgerung, daß beide Maltasen Glucomaltasen und von der der Hefe verschieden seien, die beide Substrate hydrolysiert, glaubt *Weidenhagen* dadurch widerlegt

[1] *R. Weidenhagen* in E. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. IV, Teil 2, S. 2053. — [2] *C. Neuberg*, Naturwiss. **12**, 797, 1924; *C. Neuberg* u. *E. Hofmann*, ebenda **19**, 484, 1931; siehe ferner *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, Supplement **1**, S. 171, Den Haag, 1935. — [3] *H. Pringsheim* u. *J. Leibowitz*, diese Zeitschr. **161**, 456, 1925; *J. Leibowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **149**, 184, 1925; **154**, 164, 1926; *R. Weidenhagen*, ebenda **216**, 255, 1933.

zu haben, daß er entweder doch eine geringe Zerlegung von α-Methyl-glucosid fand, in beiden Fällen aber eine kräftige Hydrolyse der entsprechenden Phenolverbindung. Betrachtet man jedoch die Wirkung der Hefemaltase, die α-Methyl-glucosid und Maltose mit Leichtigkeit spaltet, und dazu die tierische Maltase, die nur das Disaccharid zerlegt, so fragt es sich doch, ob es nicht richtiger ist, wieder auf ältere Vorstellungen zurückzugehen, die z. B. bei der Hydrolyse der β-Glucoside eine spezifische Phenolglucosidase von denjenigen Fermenten unterschieden, die β-glucosidische Disaccharide zerlegten, und die ferner besondere Enzyme für die Hydrolyse der Polysaccharide annahmen.

Aus den erwähnten Untersuchungen von *W. Grassmann* und Mitarbeitern (l. c.) geht ja schon hervor, daß wir ohne diese spezifischen Enzyme nicht auskommen können, und ein Vergleich mit der Spezifität der Sulfatasen macht einen solchen Schritt erst recht verständlich. Schließlich sind glykosidische Verbindungen eines Zuckers mit alkoholischen Hydroxylen doch recht verschieden, je nachdem, ob diese Hydroxylgruppe zu einem einfachen Alkohol gehört, ob es sich um die primäre oder sekundäre Alkoholgruppe eines Zuckers, um das Hydroxyl eines Phenols oder um ein Derivat des Phloroglucins, wie beim Phlorrhizin, handelt. Was aber das „Kernstück"[1] der *Weidenhagen*schen Hypothese anlangt, nämlich die Nichtexistenz einer Saccharase bzw. die Hydrolyse des Rohrzuckers durch α-Glucosidase und β-am-Fructosidase, so ist im Zusammenhang mit den zahlreichen oben zitierten und der Theorie widersprechenden Befunden doch zu bedenken, daß besonders in diesem Falle gar keine Bindung zwischen Zucker und alkoholischem Hydroxyl vorliegt, wie etwa bei dem α-Methyl-glucosid oder in der Maltose, sondern eine Verknüpfung der beiden Halbacetal-Gruppen zweier Zucker. Die Schwierigkeiten, die *Weidenhagen* bei der fermentativen Hydrolyse der gewissermaßen ähnlich konstituierten α-glucosidischen Trehalose durch α-Glucosidase selbst angegeben hat[2], legen diesen Gesichtspunkt nur noch näher. Die Theorie von *Weidenhagen* erspart die Annahme zweier bis dahin beschriebener Saccharasen, zweier Maltasen, ebensovieler Lactasen und einiger anderer Di- bzw. Polysaccharasen. Sie hat dazu geführt, die ihr widersprechenden Befunde anderer Autoren erst abzulehnen[3], nachdem sich dieselben jedoch häuften, sie als Anomalien zu bezeichnen. Schließlich hat sie durch Zugeständnisse diese widersprechenden Befunde keineswegs verständlich gemacht, jedoch ihren eigentlichen Sinn verloren und führt nun auf

[1] *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, Supplement 1, S. 193, Den Haag, 1935. — [2] *R. Weidenhagen*, Zeitschr. d. Ver. Deutsch. Zuckerind. **78**, 788, 1928; **82**, 912, 1932. — [3] *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **200**, 279, 1931; **216**, 255, 1933; Zeitschr. Wirtschgr. Zuckerind. **86**, 176, Februar 1936.

andere Weise Enzyme ein, die sie früher ohne Widerlegung der experimentellen Befunde anderer Autoren entschieden abgelehnt hat. Um aber nicht falsch verstanden zu werden: soweit experimentelle Ergebnisse zeigen, daß zwei Maltasen oder zwei Lactasen sich verschieden verhalten, insbesondere in einer Weise, die durch die Struktur der entsprechenden Disaccharide plausibel erscheint, liegt es uns fern, diese Unterschiede nicht anzuerkennen, aus den schon eingangs erwähnten Gründen. Aber zahllose Glykosidasen nur deshalb annehmen zu wollen, um halbwegs eine in Widersprüche mit den Versuchsergebnissen verwickelte Theorie zu stützen, die ursprünglich die Zahl der Carbohydrasen auf ganz wenige vermindern wollte, scheint uns kein geeigneter Ausweg zu sein.

Weitere Versuche.

Aus Niere und Leber, wenige Stunden nach der Schlachtung der Tiere entnommen, wurden, wie wir schon in unseren kürzlich erschienenen Arbeiten[1] angegeben haben, Autolysensäfte bzw. Alkohol-Äther-Trockenpräparate hergestellt. Für die neuen Versuche wurde außerdem l-Menthol-glucuronsäure nach dem von *C. Neuberg* und *S. Lachmann*[2] angegebenen einfachen Verfahren gewonnen, sowie der bei der Autolyse von Pferdenierenbrei erhaltene und mit einem Alkohol-Äther-Gemisch (4 : 1) behandelte Rückstand als Ferment verwendet. Von den Substraten sind gewichtsmäßig jeweils gleiche Mengen den auch in bezug auf Ferment, Pufferung und Gesamtvolumen gleichen Ansätzen zugesetzt worden. Bei vollständiger Hydrolyse konnten auf diese Weise zwar nicht absolut gleiche Mengen freier Zucker erwartet werden, die Differenzen sind jedoch nicht groß, weil auch die Molekulargewichte der einzelnen Substrate keine allzu großen Abweichungen aufweisen. Nur von Phlorrhizin ist den entscheidenden Ansätzen mit Pferdenierenpräparaten das $1^1/_2$fache der sonst angewendeten Substratmenge zugesetzt worden, entsprechend dem größeren Anteil, der in diesem Substrat dem Aglykon zukommt. Da aber bei sämtlichen Ansätzen in diesen und früheren Untersuchungen in gleicher Weise verfahren wurde, sind die Ergebnisse in bezug auf ihre Wirkung gegenüber den einzelnen Substraten ohne weiteres vergleichbar. Die von anderen Autoren vorgeschlagenen Normalbedingungen wurden schon deshalb nicht angewandt, weil sie von diesen selbst gerade in den hier interessierenden Versuchen mit Phlorrhizin, sowie auch mit anderen Substraten und Enzymen, nicht beachtet worden sind[3].

Präparate aus der Dünndarmschleimhaut wurden in gleicher Weise wie die übrigen Organpräparate gewonnen.

A. Versuche mit Präparaten aus Pferdenieren.

I. Den Ansätzen mit je 25 ccm Gesamtvolumen sind so viele ccm n Acetatpuffergemisch zugefügt worden, daß schließlich eine Konzentration von n/10 erreicht wurde.

[1] *C. Neuberg* u. *E. Hofmann*, diese Zeitschr. **281**, 431, 1935; *E. Hofmann*, ebenda **281**, 438, 1935. — [2] *C. Neuberg* u. *S. Lachmann*, ebenda **24**, 416, 1910. — [3] *R. Weidenhagen*, Zeitschr. d. Ver. Deutsch. Zuckerind. **81**, 125, 1931; *R. Weidenhagen* u. *A. Renner*, ebenda **86**, 25, 1936; vgl. *S. Veibel* u. *F. Eriksen*, Biochem. J. **30**, 163, 1936.

Als Ferment dienten in den Ansätzen

1 bis 5: je 10 ccm Autolysensaft = Ferment A,

6 bis 10: je 0,3 g Alkohol-Äther-Trockenpräparat aus frischem Organbrei = Ferment B,

11 bis 15: je 0,3 g Alkohol-Äther-Trockenpräparat aus Autolysenrückstand = Ferment R.

Die Substratmengen betrugen bei allen Ansätzen je 0,1 g, nur von Phlorrhizin 0,15 g. Nach Zugabe von etwa 1 % Toluol wurden die Gemische sofort in ein Wasserbad von 37° und dann in den Brutschrank von gleicher Temperatur gebracht. In jeweils entnommenen Proben ist von Zeit zu Zeit die frei gewordene Glucose bzw. Glucuronsäure mit *Fehling*scher Lösung, nach der Methode von *Lehmann-Maquenne* bestimmt worden. Zur Berechnung der Glucuronsäure wurde bei ihr die gleiche Reduktionskraft angenommen, wie sie von äquimolekularen Mengen Glucose bekannt ist[1]. Da Phlorrhizin erst im Verlauf der Hydrolyse völlig in Lösung geht, so sind die Konzentrationen durch die Entnahme von Proben zu einer Zeit, bei der die Zerlegung erst teilweise erfolgt ist, nicht ganz konstant zu halten. So ist es auch zu erklären, daß bei den letzten Bestimmungen etwas höhere Werte gefunden wurden als bei gleichbleibender Substratkonzentration theoretisch möglich wäre. In Wirklichkeit beweisen sie, daß die Analysen richtig und die Hydrolysen praktisch vollständig sind.

Ansatz	Ferment	Substrat	mg Cu aus 10 ccm Lösung nach		mg Zucker bzw. Uronsäure aus 10 ccm Lösung nach		% Hydrolyse nach		p_H nach
			4 Std.	21 Std.	4 Std.	21 Std.	4 Std.	21 Std.	21 Std.
1	A	Ohne Substrat . .	0,6	1,3	—	—	—	—	—
2	A	Salicin	23,8	42,8	11,5	21,2	45,8	84,3	—
3	A	l-Menthol-glucuronsäure .	4,1	10,3	1,6	4,2	8,2	20,9	—
4	A	β-Naphthol-glucuronsäure .	10,3	34,0	4,6	16,2	24,6	86,7	—
5	A	Phlorrhizin . . .	16,5	48,9	7,8	23,8	34,0	103,5	—
6	B	Ohne Substrat . .	0,0	1,2	—	—	—	—	—
7	B	Salicin	3,8	18,4	1,8	8,2	7,2	32,6	—
8	B	l-Menthol-glucuronsäure .	1,9	10,3	0,9	4,2	4,6	21,5	—
9	B	β-Naphthol-glucuronsäure .	4,8	28,9	2,3	13,7	12,3	73,4	—
10	B	Phlorrhizin . . .	29,8	43,2	14,7	21,0	64,2	91,6	—
11	R	Ohne Substrat . .	0,0	0,0	—	—	—	—	6,0
12	R	Salicin	1,3	8,9	0,6	4,2	2,4	16,7	6,0
13	R	l-Menthol-glucuronsäure .	1,3	5,1	0,6	2,2	3,1	11,2	5,9
14	R	β-Naphthol-glucuronsäure .	0,0	17,8	0,8	8,8	4,3	47,0	5,5
15	R	Phlorrhizin . . .	18,4	46,4	8,9	23,2	38,9	101,2	6,0

Aus der elektrometrischen p_H-Bestimmung nach 21 Stunden geht hervor, daß in den Ansätzen mit gepaarten Glucuronsäuren die durch die Pufferung eingestellte Wasserstoffionenkonzentration nicht ganz konstant

[1] *H. Thierfelder*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **11**, 388, 1887.

geblieben ist. Weiter unten wird jedoch gezeigt, daß dadurch keine Behinderung der Hydrolyse eingetreten sein kann.

II. Zur Bestätigung der eben beschriebenen Befunde wurden gleiche Präparate aus Organen anderer Tiere hergestellt und mit diesen Versuche an verschiedenen β-Glykosiden und unter Bedingungen, wie sie unter I. beschrieben sind, angestellt. Es bedeutet wiederum:

Ferment A = Autolysensaft, von dem in diesem Falle nur 5 ccm auf 25 ccm Gesamtvolumen verwendet worden sind (Ansätze 1 bis 4).

Ferment N ist das aus dem Autolysensaft durch Niederschlagung mit Alkohol-Äther erhaltene Fermentpräparat; von ihm sind den Ansätzen 5 bis 10 je 0,2 g zugesetzt worden.

Ferment B = Alkohol-Äther-Präparat aus frischem Nierenbrei, von dem je 0,2 g verwendet wurden (Ansätze 11 bis 16), und

Ferment R = Alkohol-Äther-Präparat aus Autolysenrückstand; von ihm dienten je 0,3 g für die Ansätze 17 bis 22.

Vom Substrat sind hier — auch vom Phlorrhizin — je 0,1 g angewendet worden.

Ansätze	Ferment	Substrat	mg Cu aus 10 ccm Lösung nach		mg Zucker bzw. Uronsäure aus 10 ccm Lösung nach		% Hydrolyse nach	
			20 Std.	44 Std.	20 Std.	44 Std.	20 Std.	44 Std.
1	A	Ohne Substrat	1,0	1,5	—	—	—	—
2	A	β-Phenol-glucosid . .	38,2	40,0	18,5	19,2	65,7	
3	A	β-Phenol-galaktosid . .	21,5	32,1	10,5	15,8	33,9	51,2
4	A	Phlorrhizin	26,6	40,4	12,6	19,6	82,5	128,0
5	N	Ohne Substrat	1,2*	1,5	—	—	—	—
6	N	β-Phenol-glucosid . .	6,4*	9,7	2,5*	4,0	8,9*	14,2
7	N	β-Phenol-galaktosid . .	14,6*	26,7	7,6*	13,8	24,6*	44,6
8	N	Salicin	10,8*	24,2	4,7*	11,2	18,7*	44,5
9	N	Phlorrhizin	24,8*	32,4	11,5*	15,0	75,0*	98,1
10	N	β-Naphthol-glucuronsäure . . .	34,9*	37,6	16,6*	18,0	88,8*	96,2
11	B	Ohne Substrat	0,0	1,3	—	—	—	—
12	B	β-Phenol-glucosid . .	8,0	21,6	4,0	9,9	14,2	35,5
13	B	β-Phenol-galaktosid . .	7,0	18,4	3,6	9,5	11,6	30,6
14	B	Salicin	14,6	30,5	7,0	14,5	27,7	57,6
15	B	Phlorrhizin	22,9	31,2	11,2	14,9	48,5	97,8
16	B	β-Naphthol-glucuronsäure . . .	17,1	33,6	8,3	16,0	44,4	85,5
17	R	Ohne Substrat	0,0	1,2	—	—	—	—
18	R	β-Phenol-glucosid . .	4,5	13,3	2,0	5,7	7,1	20,3
19	R	β-Phenol-galaktosid . .	5,2	22,4	2,7	11,0	8,7	35,3
20	R	Salicin	6,4	29,3	3,0	13,9	11,9	55,4
21	R	Phlorrhizin	24,1	34,8	16,6	12,1	78,0	108,2
22	R	β-Naphthol-glucuronsäure . . .	10,2	28,3	5,1	13,5	27,3	72,2

* Nach 16 Std.

B. Versuche mit Fermentpräparaten aus Leber und Niere verschiedener Tiere.

Aus den folgenden Versuchen ist zu ersehen, daß im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ansätzen mit Pferdenierenpräparaten aus

Leber und Niere anderer Tiere keine Phlorrhizinabspaltung zu erzielen ist, nicht einmal mit Fermenten aus Pferdeleber, obwohl sie alle auf β-Glucoside, β-Galaktoside und β-Glucuronide kräftig einwirken.

Ansätze mit Autolysensaft.

Die Ansätze enthielten in 15 ccm Gesamtvolumen je 5 ccm Autolysensaft, 10 ccm n/5 Acetatpuffer, $p_H = 5{,}7$, je 0,15 g Substrat, etwa 1% Toluol und wurden bei 37° aufbewahrt. Nach 24 und 72 Stunden wurden Proben entnommen und gegen *Fehling*sche Lösung geprüft. Es bedeutet: RN = Rindernierenautolysat, SN = Schweinenierenautolysat, RL = Rinderleberautolysat, SL = Schweineleberautolysat.

Ansatz	Ferment	Substrat	mg Cu aus 3 ccm Lösung nach		mg Zucker aus 3 ccm Lösung nach		% Hydrolyse nach	
			24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.
1	PL	Ohne Substrat	3,2	10,9	—	—	—	—
2	PL	β-Phenol-glucosid . .	31,1	—	13,9	—	98,6	—
3	PL	β-Phenol-galaktosid . .	27,6	36,2	12,3	13,1	79,6	84,8
4	PL	Phlorrhizin	4,2	10,3	0,0	0,0	0,0	0,0
5	RN	Ohne Substrat	0,0	0,0	—	—	—	—
6	RN	β-Phenol-glucosid . .	25,2	—	12,5	—	95,8	—
7	RN	β-Phenol-galaktosid . .	15,9	27,2	8,3	14,1	53,6	91,5
8	RN	Phlorrhizin	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
9	SN	Ohne Substrat	0,0	0,0	—	—	—	—
10	SN	β-Phenol-glucosid . .	98,6	—	14,1	—	100,0	—
11	SN	β-Phenol-galaktosid . .	25,4	28,2	13,3	14,7	86,1	95,4
12	SN	Phlorrhizin	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13	RL	Ohne Substrat	—	26,0	—	—	—	—
14	RL	β-Phenol-glucosid . .	—	53,0	—	13,5	—	95,6
15	RL	β-Phenol-galaktosid . .	—	50,8	—	12,4	—	80,3
16	RL	Phlorrhizin	—	25,9	—	0,0	—	0,0
17	SL	Ohne Substrat	6,4	10,5	—	—	—	—
18	SL	β-Phenol-glucosid . .	34,6	—	14,0	—	99,5	—
19	SL	β-Phenol-galaktosid . .	28,2	36,0	11,3	13,2	73,0	88,5
20	SL	Phlorrhizin	6,4	10,2	0,0	0,0	0,0	0,0

C. Versuche mit Fermentpräparaten aus Dünndarmschleimhaut verschiedener Tiere.

Schleimhaut, erhalten durch Abziehen der äußeren Wandschicht vom frischen Dünndarm von Pferd, Rind und Schwein, wurde nach sorgfältigem Waschen im Fleischwolf zerkleinert und der Organbrei zu einem Alkohol-Äther-Trockenpräparat verarbeitet, das als Ferment diente.

Ferment PD stammt vom Pferd, RD vom Rind, SD vom Schwein. Die Ansätze enthielten in 20 ccm n/10 Acetatpufferlösung $p_H = 5{,}8$, je 0,1 g Substrat, 0,2 g Ferment und etwa 1% Toluol; sie wurden bei 37° aufbewahrt. Nach 16 bzw. 24 und nach 72 Stunden entnommene Proben sind mit *Fehling*scher Lösung untersucht worden.

Ansatz	Ferment	Substrat	mg Cu aus 5 ccm Lösung nach		mg Zucker bzw. Uronsäure aus 5 ccm Lösung nach		% Hydrolyse nach	
			24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.	24 Std.	72 Std.
1	P D	Ohne Substrat	0,0*	0,9	—	—	—	—
2	P D	β-Phenol-glucosid	14,6*	28,8	6,7*	13,9	38,0*	79,2
3	P D	β-Phenol-galaktosid . . .	13,9*	18,7	7,2*	9,7	37,3*	50,2
4	P D	Phlorrhizin	—	1,9	—	0,0	—	0,0
5	P D	β-Naphthol-glucuronsäure	10,8*	21,4	4,9*	9,8	41,8*	83,6
6	R D	Ohne Substrat	2,5	3,2	—	—	—	—
7	R D	β-Phenol-glucosid	9,6	29,2	3,3	19,2	18,7	72,4
8	R D	β-Phenol-galaktosid . . .	4,5	11,9	1,0	5,0	5,2	25,9
9	R D	Salicin	8,2	17,8	2,8	12,2	17,8	77,1
10	R D	Phlorrhizin	2,8	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
11	R D	β-Naphthol-glucuronsäure	8,4	20,6	2,9	8,5	24,8	72,5
12	S D	Ohne Substrat	2,2	2,0	—	—	—	—
13	S D	β-Phenol-glucosid	15,9	33,7	6,6	14,3	37,4	81,2
14	S D	β-Phenol-galaktosid . . .	8,5	18,4	3,3	8,5	17,2	44,0
15	S D	Salicin	12,6	24,8	4,9	11,2	31,2	70,6
16	S D	Phlorrhizin	2,2	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
17	S D	β-Naphthol-glucuronsäure	5,5	13,3	1,5	5,5	12,8	47,0

* nach 16 Stunden.

D. Die p_H-Optima für die Hydrolyse der gepaarten Glucuronsäuren, des Phlorrhizins und des Salicins durch verschiedene Fermentpräparate.

I. p_H-Optima für Autolysensaft aus Pferdenieren.

Die Ansätze enthielten in 25 ccm Gesamtvolumen je 100 ccm Fermentlösung + 15 ccm m/5 Puffergemisch aus Na_2HPO_4 und Essigsäure vom jeweils angegebenen p_H, sowie als Substrat 0,15 g Salicin oder Phlorrhizin bzw. 0,1 g β-Naphthol- oder l-Menthol-glucuronsäure + 1 % Toluol. $T = 37°$. Prüfung von Proben mit *Fehling*scher Lösung nach 5, 22 und 46 Stunden ergaben folgende Cu-Mengen.

p_H	mg Cu aus 10 ccm Lösung bei den Ansätzen mit					
	Salicin	Phlorrhizin	β-Naphthol-glucuronsäure		l-Menthol-glucuronsäure	
	nach 5 Std.	nach 5 Std.	nach 5 Std.	nach 22 Std.	nach 22 Std.	nach 46 Std.
4,7	34,3	—	11,8	**36,2**	14,0	20,0
5,3	35,3	18,0	**13,4**	35,3	**14,0**	20,0
5,9	**39,1**	24,2	11,8	35,9	14,0	20,3
6,5	38,8	**26,1**	10,5	26,1	8,0	8,0
7,3	35,8	22,9	—	—	4,2	41

Das p_H-Optimum liegt also für die Hydrolyse von Salicin und Phlorrhizin durch Pferdenierenautolysat bei p_H 5,9 bis 6,5. Für die Zerlegung gepaarter Glucuronsäuren durch Ferment aus Ochsennieren hat schon *H. Masamune*[1] einen Wert von etwa 5,3 angegeben, der durch

[1] *H. Masamune*, J. of Biochem. **19**, 353, 1934.

Ansatz	Substrat	mg Cu aus 10 ccm Lösung nach				mg Zucker bzw. Uronsäure aus 10 ccm Lösung nach				% Hydrolyse nach			
		1 Std.	3 Std.	24 Std.	48 Std.	1 Std.	3 Std.	24 Std.	48 Std.	1 Std.	3 Std.	24 Std.	48 Std.
E 1	Ohne Substrat	1,6	1,6	1,9	1,9	—	—	—	—	—	—	—	—
E 2	β-Phenol-glucosid	11,8	32,5	—	—	4,9	15,5	—	—	17,4	55,2	—	—
E 3	Salicin	45,1	48,2	—	—	21,5	23,5	—	—	85,5	93,6	—	—
E 4	Phlorrhizin	1,6	1,6	6,4	8,5	0,0	0,0	2,1	3,0	0,0	0,0	13,7	19,6
E 5	β-Naphthol-glucuronsäure	—	1,6	—	1,8	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0
E 6	l-Menthol-glucuronsäure	—	1,6	—	9,2	—	0,0	—	3,2	—	0,0	—	16,2
T 1	Ohne Substrat	1,3	1,3	2,5	4,8	10,5	23,6	—	—	37,4	84,1	—	—
T 2	β-Phenol-glucosid	22,9	49,0	—	—	11,0	22,6	—	—	43,6	89,9	—	—
T 3	Salicin	23,8	46,4	—	—	0,0	0,9	5,4	7,5	0,0	5,8	35,2	49,0
T 4	Phlorrhizin	1,8	3,2	13,8	20,3	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0
T 5	β-Naphthol-glucuronsäure	—	1,6	—	4,8	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0
T 6	l-Menthol-glucuronsäure	—	1,6	—	5,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0

die vorstehenden Versuche bestätigt wird. Im übrigen sieht man, daß bei p_H-Werten von 5,0 bis 6,0 keine größeren Unterschiede in der Fermentwirkung bestehen.

II. p_H-Optimum der Phlorrhizinhydrolyse durch Taka-Diastase.

Sechs Ansätze: 0,1 g Phlorrhizin + 0,3 g Takadiastase + 25 ccm m/10 Puffergemisch aus Na_2HPO_4-Lösung + Essigsäure von jeweils angegebenem p_H + 1% Toluol. $T = 37°$. Nach 20 Stunden wurden 10 ccm-Proben quantitativ mit *Fehling*scher Lösung geprüft und folgende Cu-Mengen gefunden.

mg Cu . . .	23,9	**25,4**
Bei p_H . .	4,4	4,7
Rotfärbung .	—	—

mg Cu . . .	24,6	17,1	15,2
Bei p_H . . .	5,3	5,9	6,7
Rotfärbung .	+	++	+++

Die im theoretischen Teil erwähnte Rotfärbung, die vermutlich auf Oxydation des freien Aglykons (Phloretins) zurückzuführen ist, war bei den Ansätzen mit p_H 4,4 bis 4,7 nach 20 Stunden noch nicht zu beobachten, wohl aber bei den übrigen Versuchen: sie nahm mit den p_H-Werten zu.

E. Vergleich der Hydrolyse von β-Glucosiden, β-Glucuroniden und Phlorrhizin durch Emulsin und Taka-Diastase.

Ansätze enthielten in 50 ccm m/10 Acetatpufferlösung $p_H = 5,0$, 0,2 g Substrat, 1% Toluol und 100 mg Emulsin (*Merck*) [Ansätze *E*], bzw. 200 mg Taka-Diastase (*Sankyo*) [Ansätze *T*]. Sie wurden sofort in warmes Wasser

von 37° und dann bei gleicher Temperatur in den Brutschrank gebracht. 10 ccm-Proben dienten zur Bestimmung der freien Zucker bzw. der Glucuronsäure nach 1, 3, 24 und 48 Stunden.

Diese Versuche lehren, daß die Salicinhydrolyse durch Emulsin mindestens viermal so schnell erfolgt wie die des β-Phenol-glucosids, während beide Substrate durch Taka-Diastase gleich schnell gespalten werden. Dagegen wird Phlorrhizin durch Taka-Diastase weitgehend in einer Zeit zerlegt, in der Emulsin nur eine geringe Einwirkung zeigt.

Durch Taka-Diastase wird keine der beiden gepaarten Glucuronsäuren in nennenswertem Umfange angegriffen, durch Emulsin nur die l-Mentholverbindung. Weiter oben wurde jedoch gezeigt, daß Pferdenierenpräparate sich gegen die beiden Glucuronide gerade umgekehrt verhalten und sie weitgehend hydrolysieren.

Über die Phosphatasen von Hefe.

Von **Werner Schuchardt.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 8. April 1936.)

Wie von mir bereits kurz mitgeteilt wurde[1], gelingt es durch ein selektives Inaktivierungsverfahren mit verdünnter Säure bzw. verdünntem Alkali zwei isodyname Phosphatasen[2] in *Hansenula (Willia) javanica (Groenewege)* nachzuweisen. Die Versuche habe ich auch auf zwei Hefenstämme ausgedehnt, die nach dem *Koch*schen Plattenverfahren aus Schultheiß-Patzenhofer-Hefe isoliert wurden; sie werden im folgenden eingehend dargestellt werden. Zur Erfassung von Spaltungsunterschieden, die bei saurer oder alkalischer Behandlung der Hefe gegenüber dem frischen oder getrockneten Präparat möglicherweise zum Ausdruck kamen, wurde die enzymatische Hydrolyse des α- und β-Glycerophosphats an frischer Hefe und ihrem Trockenpräparat über ein großes p_H-Bereich untersucht. Ferner sollte geprüft werden, ob durch den Trocknungsvorgang Aktivitätsänderungen gegenüber den genannten Substraten stattgefunden hatten. Die erzielten Ergebnisse werden im einzelnen im Versuchsteil besprochen.

Experimenteller Teil.

I. Versuche mit Hansenula (Willia) javanica (Groenewege[3]).

Hansenula wurde auf Würze-agar gezüchtet. Sie wurde nach 2 Tagen vom Nährboden mit sterilem Wasser abgeschwemmt und an der Zentrifuge zweimal gewaschen. Von der so erhaltenen Hefe wurden 15 g in 50 ccm Wasser aufgeschlämmt und 3 ccm zu den auf 34° gebrachten Ansätzen gegeben (siehe Tabelle I).

Tabelle I. Durch frische Hansenula aus α- und β-Natrium-glycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
1	9,0	7,5	32,5	23,0	8,5	4,0	1,5	0	0	0	2,5	4,0
3	28,5	26,5	61,0	45,5	44,0	32,5	9,0	6,5	22,5	18,0	28,0	20,0
24	73,0	69,5	95,0	88,5	83,5	69,0	45,5	43,0	70,0	73,0	62,0	62,0
p_H	3,3	3,3	4,0	4,0	5,0	5,0	6,0	6,0	7,0	7,0	8,7	8,7

[1] Diese Zeitschr. **283**, 433, 1936. — [2] Damit soll nur gesagt sein, daß die hier mitzuteilenden Versuche zwei isodyname Phosphatasen erkennen lassen. Die Möglichkeit einer noch weiteren Aufteilung der beiden o-Phosphorsäure-ester spaltenden Enzyme, z. B. in eine *absolut spezifische* α- und eine β-Glycerophosphatase, muß weiterer Prüfung vorbehalten bleiben. — [3] Der Stamm wurde im hiesigen Institut von Frl. *Edith Weiss* isoliert (siehe *C. Neuberg* u. *E. Hofmann*, Naturw. **23**, 484, 1935).

In allen Fällen wurden folgende Ansätze bei 34° vorgenommen:

5 ccm Puffer (p_H 3,3 bis 6,3 Acetatpuffer, p_H 6,7 bis 8,8 Veronalpuffer),
1 ccm m/10 Magnesiumsulfat,
1 ccm einer Lösung von α- (*Rhône-Poulenc*[1]) bzw. β-glycerinphosphorsaurem Natrium bzw. andere Substrate (2,0 mg P/ccm) bzw. Wasser (Kontrollversuch),
3 ccm Hefensuspension,
3 Tropfen Toluol.

Während die frische Hefe bei p_H 6,0 in den ersten Stunden die beiden Substrate nur wenig, maximal zu 17 %, dephosphoryliert — die Versuche wurden unter analogen Bedingungen mehrfach wiederholt — greift das Trockenpräparat in dem um den Neutralpunkt liegenden Gebiet die beiden Glycerophosphate schon nach einstündiger Einwirkung stark an (siehe Tabelle II). Dazu sei bemerkt, daß die Spaltungsgrade der genannten Substrate durch zu verschiedenen Zeiten gezüchtete Hefen auch bei möglichster Einhaltung derselben Wachstumsbedingungen bei kurzdauernder Einwirkung Schwankungen unterworfen sind; doch ändern diese nichts am Gesamtbild.

Tabelle II. Durch Trockenhefe (Hansenula) aus α- und β-Natrium-glycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
1	8,0	4,0	22,0	16,0	19,0	15,0	42,5	20,0	39,5	36,5	19,5	19,0
3	33,5	17,5	54,5	39,5	42,0	27,0	75,5	53,0	72,5	66,5	39,5	34,5
24	71,5	58,5	90,0	82,5	91,0	86,0	100,0	100,0	100,0	100,0	72,5	76,0
p_H	3,3	3,3	4,0	4,0	5,0	5,0	6,3	6,3	7,5	7,5	8,8	8,8

Eine Suspension von 3 g Trockenhefe (frische, zweimal gewaschene Hansenula auf Tontellern grob getrocknet und im Vakuumexsikkator schnell entwässert) in 60 ccm Wasser wurden in der üblichen Weise den Ansätzen zugegeben.

Die schwache Spaltung mit frischer Hefe zwischen p_H 6,0 und 7,5 nach mehrstündiger Einwirkung ließ die Anwesenheit eines Hemmungskörpers vermuten, der beim Trocknungsvorgang weitgehend zerstört wird und gegen alkalische Einflüsse empfindlich ist. Diese Hypothese müßte durch die Isolierung des Hemmungskörpers gestützt werden, die bisher nicht gelungen ist. Deshalb sei vorläufig angenommen, daß beim Trocknungsvorgang wie auch bei der Einwirkung von Alkali eine Freilegung der Phosphatase aus einer Verankerung erfolgt, und daß sie bei diesem in der Frischhefe herrschenden Zustand den untersuchten

[1] Das Präparat hat Herr Prof. *Délepine*, Paris, freundl. Herrn Prof. *Neuberg* gesandt.

Tabelle III. Aus α- und β-Natriumglycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Versuche mit der	Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
mit Essigsäure behandelten frischen Hefe	1	6,5	6,0	27,5	15,0	6,0	3,5	0	0	0,5	0	1,0	1,5
	3	20,5	21,5	53,5	31,5	14,5	8,0	0	0	0	1,0	0	1,0
	20	60,0	42,0	91,5	64,5	43,0	30,5	0	0	1,0	1,5	1,0	1,0
mit Ammoniak behandelten frischen Hefe	1	0	1,0	0	0,5	0	0	34,0	31,5	54,5	58,5	15,5	31,0
	3	0	2,5	0	2,0	0	0	73,5	73,5	81,0	82,5	38,5	60,5
	20	0	0	0	0	16,5	21,5	89,5	98,0	92,5	92,5	73,0	71,5
	p_H	3,3	3,3	4,0	4,0	5,0	5,0	6,6	6,6	7,9	7,9	8,8	8,8

Substraten gegenüber in ihrer Wirksamkeit geschwächt ist[1]. Eine wirkliche Erklärung bedeutet allerdings diese Feststellung, die sich einer experimentellen Prüfung als schwer zugänglich erweist, nicht.

Die vorhergehenden Versuche sagen nichts sicheres darüber aus, ob die Wirksamkeit dieser Hefe mehreren Phosphorsäureester hydrolysierenden Enzymen zuzuschreiben ist. Zwar läßt ein Vergleich der Resultate von frischer Hansenula mit ihrem Trockenpräparat die Deutung zu, daß zwei isodyname Phosphatasen vorhanden sind, eine mit einem Optimum bei p_H 4,0 und eine andere mit einer maximalen Wirkung beim Neutralpunkt, die aus noch nicht geklärten Gründen in ihrer Spaltungsintensität den beiden Phosphorsäureestern gegenüber im frischen Zustand stark geschwächt ist. Die Resultate der folgenden Versuche sprechen nun aber eindeutig für das Vorhandensein von mindestens zwei absolut spezifischen Phosphoesterasen.

15 g frische Hefe wurden mit 30 ccm n Essigsäure und 0,2 ccm Toluol 2 Stunden geschüttelt. Die zu diesen Inaktivierungsversuchen benutzte Schüttelmaschine war immer so eingestellt, daß nur ein langsames Hin- und Hergleiten der Suspension stattfand. Nach 2 Stunden wurde nach Verdünnen auf 90 ccm zentrifugiert, die niedergeschlagene Hefe mit verdünntem Ammoniak ungefähr neutralisiert und dann noch zweimal mit 90 ccm Wasser an der Zentrifuge gewaschen. Die Niederschläge wurden in 50 ccm Wasser suspendiert und damit die Versuche in der üblichen Weise angesetzt.

Ebenso wurden 15 g frische Hefe mit 30 ccm 0,3 n Ammoniak und 0,2 ccm Toluol 3 Stunden geschüttelt und nach dem Stehen-

[1] Vgl. auch die Beobachtungen bei Versuchen mit frischer Hefe mit und ohne Toluol (S. 452).

lassen über Nacht wie oben angegeben zentrifugiert und gewaschen (Tabelle III).

Es wurden mannigfache Versuche unternommen, die aber stets prinzipiell dasselbe Ergebnis hatten. Längere Einwirkung der Säure oder Base hatte zwar auch eine Aktivitätseinbuße der sauren bzw. alkalischen Phosphatase zur Folge, doch kommt immer klar zum Ausdruck, daß *verdünnte Essigsäure die zwischen p_H 6,0 und 8,8 untersuchte alkalische Phosphatase vor allem inaktiviert, während Ammoniak die Wirkung des im sauren Gebiet wirksamen Isodynamen zerstört*, und ferner, daß *die Spaltungsintensität der frischen dem basischen Einfluß unterworfenen Hefe bei p_H 6,0 bis 8,8 gegenüber der unbehandelten Hefe stark zunimmt*. Besonders deutlich zeigt dies ein Versuch, bei dem neben α-Glycerinphosphat und seinem β-Isomeren andere Phosphorsäureester untersucht werden (Tabelle IV). Dabei müssen vor allem beim Hexosemonophosphat und Hexose-diphosphat auch intermediäre Veränderungen in Betracht gezogen werden. Auf jeden Fall treten auch hier die Unterschiede zwischen dem Verhalten der mit NH_3 behandelten und der unbehandelten Hefe klar zutage.

Tabelle IV. Aus α- und β-Glycerinphosphorsäure, Hexose-di- (Hdp.) und -mono-phosphorsäure (Hmp.) (Robison-Ester), Phosphobrenztraubensäure (Phbrt.) und 3-Phosphoglycerinsäure (Phgls.) abgespaltener P in Prozent[1].

Versuche mit	Stunden	α-Salz	β-Salz	Hdp.	Hmp.	Phbrt.	Phgls.
frischer Hansenula	1	6,0	4,0	9,5	13,0	4,5	2,0
	3	20,0	10,0	22,0	34,0	10,5	6,5
	22	86,0	86,0	79,0	80,5	61,5	61,5
derselben 5 Stunden mit Ammoniak behandelten frischen Hansenula	1	42,5	43,0	29,5	50,0	29,5	28,5
	3	69,0	71,0	50,5	77,0	49,5	49,5
	20	90,5	89,0	90,5	100,0	74,0	77,5
p_H		6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4

Besonders interessierte das Verhalten der Phosphorbrenztraubensäure (Phbrt.[2]) und der aus Gäransätzen nach *C. Neuberg* und *M. Kobel*[3] isolierten 3-Phosphoglycerinsäure (3-Phgls.). Letztere geht über 2-Phgls. in Phbrt[4] über. Es fragte sich nun, ob dieser Vorgang in der frischen Hefe bei Gegenwart von Toluol dadurch nachweisbar war, daß die aus Phgls. gebildete Phbrt. langsamer dephosphoryliert wurde, als ihre Bildung erfolgte. Dies ist tatsächlich der Fall (s. Tabelle V). Zum Nachweis der entstandenen Phbrt. wurde ihr Verhalten gegen alkalische Jodlösung[5]

[1] Die Ansätze wurden ebenso bereitet, wie dies S. 449 angegeben ist. — [2] *K. Lohmann* u. *O. Meyerhof*, Diese Zeitschr. **273**, 60, 1934. — [3] Ebenda **263**, 219, 1933. — [4] *O. Meyerhof* u. *W. Kiessling*, ebenda **276**, 239, 1935. — [5] *K. Lohmann* u. *O. Meyerhof*, l. c.

benutzt. Zur Kontrolle wurde außerdem noch die durch Alkali verseifbare Phosphorsäure bestimmt. Folgende Ansätze wurden bei 34° untersucht:

Tabelle V.

Minuten	% abgespaltener P	% J-alkaliverseifbarer P
80	4,0	8,5
160	16,5	15,0
250	39,0	18,5

15 ccm Suspension (15 g frische Hansenula in 50 ccm Wasser),
25 ccm Wasser,
5 ccm m/10 Magnesiumsulfat,
5 ccm 3-Phosphoglycerinsäure (2,0 mg P pro ccm) bzw. Wasser (Kontrollversuch),
0,25 ccm Toluol.

Nach den in der Tabelle V angegebenen Zeiten wurden 5 ccm abgenommen, mit 5 ccm 10%iger Trichloressigsäure enteiweißt und vom Filtrat je 2 ccm (d. h. 1 ccm Urlösung) zur Bestimmung des anorganischen, alkali- und jodalkali-verseifbaren P[1] benutzt. Bei den in der Tabelle angegebenen Werten für den jodalkali-verseifbaren P ist der anorganische P berücksichtigt. Ansätze, die unter denselben Bedingungen nur ohne Toluol bereitet wurden, gaben nach 250 Minuten weder eine nennenswerte Abspaltung von anorganischem P noch eine merkliche Phbrt.-Bildung[5]. In Tabelle VI werden Versuche mit Hansenula (Acetatpuffer) mitgeteilt, die diese Beobachtung für p_H 6,3 belegen, und es sei bemerkt, daß beim Neutralpunkt (Veronalpuffer) analoge Resultate erhalten wurden. Eine der Kontrolle zugängliche Erklärung für diesen Einfluß des Toluols ist nicht möglich. Daß geringe Mengen eines Narkotikums einen Einfluß auf fermentative Vorgänge haben, ist z. B. von *C. Neuberg* und *N. N. Iwanoff*[2], *C. Neuberg* und *F. F. Nord*[3] und von *K. Myrbäck* und *H. v. Euler*[4] an frischer Hefe festgestellt.

Tabelle VI. Mit frischer Hansenula aus Phgls., Phbrt., Hdp., Hmp., α- und β-Natriumglycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Versuche	Stunden	Phgls.	Phbrt.	Hdp.	Hmp.	α-Salz	β-Salz
ohne Toluol	1	0,5	0,5	1,5	2,5	0	0
	3	2,0	1,5	2,5	3,0	1,0	0,5
	22	5,0	9,0	24,5	30,0	4,5	7,5
mit Toluol	1	0	0	2,0	3,5	0	0
	3	6,5	5,0	7,0	10,0	11,5	9,5
	22	96,5	91,0	95,0	99,5	85,0	89,5
p_H		6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3

[1] D. h. der aus Phbrt. durch alkalische Jodlösung abgespaltenen Phosphorsäure. — [2] Diese Zeitschr. **67**, 1, 1914. — [3] Ebenda **67**, 12, 1914. — [4] Zeitschr. f. physiol. Chem. **183**, 226, 1929. Diese Beobachtung soll auch mit andern Substraten weiter untersucht werden.

Schließlich seien noch die Inaktivierungsversuche mit dem Trockenpräparat wiedergegeben. Es wurden 3 g Trockenhefe (Hansenula) mit 30 ccm n Essigsäure bzw. 30 ccm 0,3 n Ammoniak 5 Stunden geschüttelt. Dann wurde die ammoniakalische Suspension zentrifugiert und gewaschen, wie dies oben beschrieben ist, und ebenso die essigsaure nach dem Stehen über Nacht. Die mit diesen Rückständen in 55 ccm Wasser angesetzten Versuche ergeben ein Resultat (s. Tabelle VII), wie es auch mit frischer Hefe erzielt worden war.

II. Versuche mit einem Hefenstamm aus Schultheiß-Patzenhofer-Hefe.

Aus Schultheiß-Patzenhofer-Hefe wurden nach dem *Koch*schen Plattenverfahren zwei Stämme isoliert. Diese verhielten sich bei ihrer Untersuchung auf ihr phosphatatisches System so ähnlich, daß im folgenden nur die Versuche mit einem Stamm (A) mitgeteilt werden sollen.

Zu den Versuchen wurden folgende Suspensionen benutzt:

15 g frische Hefe A in 50 ccm Wasser (Tabelle VIII, S. 454) bzw. 1 g Trockenpräparat (bereitet wie bei Hansenula angegeben) in 60 ccm Wasser (Tabelle IX, S. 454).

Die frische Brauereihefe (Schultheiß-Patzenhofer-Brauerei) verhält sich ähnlich wie die Hefe A. Bei jener konnte nach 1 Stunde ebenfalls nur eine schwache Spaltung des α- und β-Isomeren beim Neutralpunkt beobachtet werden, während allerdings nach 3 Stunden meist schon die starke Hydrolyse des α-Salzes deutlich in Erscheinung tritt. So wurden z. B. in einem Versuch bei p_H 6,5 nach 3 Stunden 74,0 % α- und 17,5 % β-Salz dephosphoryliert, während die entsprechenden Werte nach 1 Stunde 7,5 und 9,5 % waren. Beim Trockenpräparat der aus der Brauerei bezogenen Hefe fällt

Tabelle VII. Aus α- und β-Natriumglycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Versuche mit der	Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
mit Essigsäure behandelten Trockenhefe	1	4,5	2,5	11,5	7,5	4,0	3,5	0	0,5	0,5	0	—	—	2,0	0,5
	3	12,0	8,0	27,5	20,0	13,5	10,0	0	0	0	0	—	—	0	0
	24	46,0	30,0	65,5	53,0	42,5	31,0	7,0	4,0	4,5	3,0	—	—	3,0	2,5
mit Ammoniak behandelten Trockenhefe	1	—	—	0	0	0	1,5	19,5	18,0	27,0	35,5	31,5	39,0	13,5	26,0
	3	—	—	0,5	0	0	0	48,5	45,0	63,0	76,5	63,0	70,0	33,0	53,0
	48	—	—	0,5	0,5	12,5	12,5	100,0	100,0	100,0	96,0	98,5	97,0	65,5	79,0
	p_H	3,3	3,3	4,0	4,0	5,0	5,0	6,2	6,2	7,5	7,5	8,0	8,0	8,8	8,8

Tabelle VIII. Durch frische Hefe A aus α- und β-Natriumglycerophosphat abgespaltener P in Prozent.

Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
1	10,5	12,5	13,0	25,5	9,0	11,5	6,5	12,5	0	0	1,0	1,0
3	38,5	43,5	35,0	49,0	29,0	31,5	19,5	26,0	1,5	1,5	13,5	27,5
20	74,0	78,5	63,5	89,0	62,0	75,0	71,0	41,5	54,0	56,0	63,0	65,0
p_H	3,3	3,3	4,0	4,0	5,0	5,0	6,5	6,5	7,3	7,3	8,7	8,7

Tabelle IX. Durch Trockenhefe (A) aus α- und β-Natriumglycerophosphat abgespaltener P in Prozent.

Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
1	6,0	7,0	5,5	7,5	10,0	11,5	45,0	6,5	31,0	21,5	8,5	17,0
3	12,0	13,5	13,5	19,0	17,0	17,0	61,5	14,5	58,0	43,5	29,0	39,0
22	—	—	45,5	62,5	67,5	65,0	90,0	83,5	81,0	100,0	—	—
p_H	3,3	3,3	4,0	4,0	5,0	5,0	6,5	6,5	7,8	7,8	8,7	8,7

ebenso wie bei dem der Hansenula und Hefe A diese anfängliche Hemmung weg. Es wurde zu diesen Versuchen ebenfalls 1 g Trockenhefe in 60 ccm Wasser suspendiert. In Tabelle X sind nur die bei p_H 6,4, 7,8 und 8,8 erhaltenen Werte angegeben, da die im sauren Gebiet gefundenen mit den von Trockenhefe A nahezu übereinstimmen. Es fällt auf, daß die auf Würze-agar gewachsene Brauereihefe im alkalischen Gebiet eine starke Spaltungsintensität dem β-Salz gegenüber aufweist, die bei der aus dem Betrieb bezogenen Brauereihefe bei weitem nicht in diesem Maße in Erscheinung tritt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Kulturbedingungen auf das phosphatatische System wurde ferner Hefe A noch in Würze gezüchtet. Es sei nur ein Versuch mit Trockenpräparat (1 g in 60 ccm Wasser) angegeben, da dieser vor allem interessiert (Tabelle X). Beim Vergleich mit Tabelle IX und X ist ein solcher Einfluß zweifellos festzustellen. Doch kann man aus diesen Versuchen in Verbindung mit den bei Hansenula gemachten Feststellungen nicht auf das Vorhandensein einer absolut

Tabelle X.
Durch Trockenhefe (Schultheiß-Patzenhofer-Brauerei) aus α- und β-Natriumglycero-phosphat abgespaltener P in Prozent

Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
1	54,0	8,5	32,5	5,5	1,5	1,5
3	85,0	21,0	65,5	14,0	7,0	1,0
20	98,5	35,5	69,0	29,0	21,0	10,0
p_H	6,4	6,4	7,8	7,8	8,8	8,8

spezifischen α- und einer β-Glycero-phosphatase mit einem Wirkungsbereich von ungefähr 6,0 bis gegen 8,5 schließen. Der Beweis für eine solche Annahme müßte durch die Trennung der beiden Fermente, zum mindestens aber durch die Zerstörung des einen von ihnen erst erbracht werden.

Die Inaktivierungsversuche mit Hefe A verliefen ebenso, wie dies für Hansenula mitgeteilt wurde. Es wurde dabei in erster Linie Wert darauf gelegt, den Effekt der Behandlung mit Säure bzw. Alkali zu beobachten, ohne in mühsamen Versuchen die optimalen Bedingungen zu studieren. Doch zeigten bereits diese orientierenden Versuche die Empfindlichkeit auch der alkalischen Phosphatase der Hefe A gegenüber Ammoniak. Bei 20stündiger Einwirkung wird sie stark geschädigt (zu etwa 70 bis 80%). Bei Übertragung dieser Methode auf andere Organismen muß also durch Vorversuche mindestens die Empfindlichkeit der betreffenden Systeme gegen sauren und alkalischen Einfluß zuerst festgestellt werden.

Es seien hier nur Versuche mit Trockenhefe mitgeteilt. Die Behandlung von je 1 g Trockenpräparat mit 30 ccm 0,66 n Essigsäure bzw. 0,2 n Ammoniak und ihre Aufarbeitung geschahen ebenso wie

Tabelle XI. Durch Trockenhefe (A, in Würze gezüchtet) aus α- und β-Natriumglycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
1	61,5	8,0	35,0	8,0
3	90,0	23,5	61,0	22,0
22	100,0	72,5	81,0	65,0
p_H	6,5	6,5	7,5	7,5

Tabelle XII. Aus α- und β-Natriumglycero-phosphat abgespaltener P in Prozent.

Versuche mit der	Stunden	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz	α-Salz	β-Salz
mit Essigsäure behandelten Trockenhefe (A)	1	7,5	8,5	3,5	3,5	3,5	0	3,5	0	0	0
	3	12,0	15,5	5,5	12,5	11,0	1,5	7,5	5,5	1,0	1,5
	20	45,0	57,0	36,0*	48,0*	13,5	8,0	20,5	17,0	3,5	5,0
mit Ammoniak behandelten Trockenhefe (A)	1	3,0	5,5	3,0	0	49,5	10,0	50,0	42,0	15,5	28,5
	3	1,0	0	7,0	6,0	66,5	30,0	55,5	67,5	22,0	46,5
	20	5,5	1,5	33,0	23,5	87,0	90,5	81,0	100,0	40,0	81,5
p_H		4,0	4,0	5,5	5,5	6,7	6,7	8,0	8,0	8,8	8,8

* $p_H = 5{,}0$.

bei Hansenula. Die Suspensionen wurden 1½ Stunden geschüttelt (Tabelle XII).

Die vorliegenden Versuche lassen den Schluß zu, daß in Hefen zwei isodyname Phosphatasen vorhanden sind, von denen dem sauren Isodynamen nach den bisher gemachten Erfahrungen[1] die Fähigkeit zukommt, alle untersuchten Phosphorsäureester zu spalten, ohne daß stark ausgeprägte relative Spezifitäten hervortraten. Bei der alkalischen Phosphatase dagegen zeigen sich bei der Brauereihefe deutliche relative Spezifitäten, die bei reingezüchteten Hefen, vor allem wenn sie auf Würzeagar gewachsen waren, kaum mehr zum Ausdruck kommen. Die tiefere Ursache für das verschiedene Verhalten der frischen Hefe, des dem ammoniakalischen Einfluß ausgesetzten Präparats und der getrockneten Hefe bei p_H 6,0 bis 7,5 sowie die Beobachtungen über die Rolle des Toluols bedürfen noch der Aufklärung.

[1] *H.* u. *E. Albers*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **235**, 47, 1935; s. auch *W. Schuchardt*, diese Zeitschr. **278**, 164, 1935 u. *C. Neuberg* u. *W. Schuchardt*, im Druck.

Autorenverzeichnis.

D'Alessandro, G. und *S. Petrucci.* Über den Einfluß einiger Fettsäuren auf die Blutglykolyse. S. 72.

Allers, Rudolf und *Josef Brill.* Über das Verhalten des Blutzuckers bei Tauben unter der Einwirkung einiger zentral angreifender Gifte. S. 6.

Barth, H. Physikalische Versuche zum Problem der mitogenetischen Strahlung. S. 311.

Barrenscheen H. K. und *Herbert Prinz.* Über Melanogen und Melanin. S. 130.

Benedict, J. und *G. Mayer.* Einfluß der Ketonkörper auf die Serumlipase. S. 299.

Bloch, K. Über phosphorhaltige Lipoide aus humanen Tuberkelbazillen. S. 372.

Boxer, Georg s. *Regine Kapeller-Adler.*

Braun, W. und *A. Frey.* Stoffwechseluntersuchungen von Aspergillus niger. I. Mitteilung: Einfluß von Phytin auf Stoffwechselvorgänge von Aspergillus niger. S. 219.

Brill, Josef. Über Senkung der Körpertemperatur bei Vögeln nach Einverleibung pyrogener Stoffe. S. 1.

Brill, Josef s. *Rudolf Allers.*

Christian, Walter s. *Otto Warburg.*

Chrząszcz, Tadeusz und *Józef Janicki.* Über die Vermehrung der aktiven Amylasemenge im ungekeimten Getreide durch Schwefelwasserstoff und Papain. S. 47.

— und *Mikołaj Zakomorny.* Die Bedingungen der biochemischen Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze. S. 340.

— — Über die Bedeutung der Äpfelsäure bei der Umbildung der Essigsäure in Citronensäure durch verschiedene Schimmelpilze. S. 348.

Ciaranfi, Enrico. Über den Abbau der Buttersäure durch überlebende Leberschnitte. S. 228.

— Bemerkung zur Bestimmung des respiratorischen Quotienten von Gewebsschnitten in Phosphatringer. S. 238.

Clarenz, L. s. *G. Pfeiffer.*

Dammann, Else s. *F. F. Nord.*

Eisler, B., K. G. Rosdahl und *H. Theorell.* Über die Mikrobestimmung des Kupfers mit Hilfe der lichtelektrischen Photometrie. S. 76.

Földes, Franz. Erwiderung auf die Bemerkungen von Kapeller-Adler über meine in dieser Zeitschrift **283**, 199, 1936 erschienene Arbeit. S. 294.

Frey, A. s. *W. Braun.*

Fuchs, Hans J. s. *Z. Zakrzewski.*

Geness, S. G. und *W. P. Komissarenko.* Über die physiologischen Schwankungen des Blutzuckerspiegels bei Kaninchen und Hunden. S. 420.

Groscurth, G. und *R. Havemann.* Entgegnung auf die vorstehende Bemerkung F. J. W. Roughtons zu unserer Arbeit über Carb-Hämoglobin. S. 153.

Haas, Erwin. Mikrohydrierung mit Hydrosulfit. S. 368.

Hatakeyama, Tatsuo. Über eine bisher nicht beschriebene experimentelle Hyperlipämie bei Kaninchen, zugleich ein Beitrag zur Erkenntnis der Genese der Aderlaßlipämie. S. 11.

Haugaard, G. und *Erling Lundsteen.* Über die Messung des p_H im Blute mit Hilfe der Glaselektrode. S. 270.

Havemann, R. s. *G. Groscurth.*

Hinsberg, K. Über die Bestimmung der Hydroxylzahl von Oxyfettsäuren. S. 125.

Hofmann, E. Zur Spezifität der Glykosidasen. S. 429.

Hofstetter, Heinrich s. *F. F. Nord.*

Hürtzr, J. s. *E. Werle.*

Janicki, Józef s. *Tadeusz Chrząszcz.*

Jesserer, Hans s. *Fritz Lieben.*

Joachim, Jiří s. *Karel Wenig.*

Kapeller-Adler, Regine. Bemerkung zur Arbeit „Franz Földes: Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin". S. 123.

— Schlußbemerkung zur Arbeit: „Franz Földes, Das Vorkommen des Histidins im menschlichen Urin". S. 296.

— und *Georg Boxer.* Über arsenhaltige Azoproteine und über die Kuppelungsfähigkeit von Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Oxyprolin mit Diazobenzolarsinsäure. S. 55.

Karrer, Paul und *Otto Warburg.* Jodmethylat des Nicotinsäureamids. (Kurze Mitteilung). S. 297.

Komissarenko, W. P. s. *S. G. Geness.*

Kraut, H. s. *W. i. Pantschenko-Jurewicz.*

Kylin, Eskil und *Friedrich Paulsen.* Der isoelektrische Punkt des Fibrinogens. S. 159.

Lasnitzki, A. Über den Einfluß der Kationen auf das Gärvermögen der Tumorzelle. VI. Mitteilung: Calcium und Magnesium (2. Teil). S. 101.

Laszt, L. und *F. Verzár.* Beeinflussung der Fettwanderung durch Jodessigsäure und Nebennierenexstirpation. S. 356.

Lederer, Fritz s. *L. I. Weber.*

Lieben, Fritz und *Hans Jesserer.* Studien zur Biuretreaktion der Proteine. S. 36.

Ludány, G. v. Die Wirkung der ultravioletten Strahlung auf das Villikinin. S. 192.

Lüdtke, Max. Zur Frage des Säurecharakters der Cellulose; zugleich eine Mitteilung über Oxydationsvorgänge an Membranstoffen. S. 78.

Lundsteen, Erling s. *G. Haugaard.*

Maurer, Kurt und *Bruno Schiedt.* Das Verhalten der d-Araboascorbinsäure und des Vitamins C gegenüber Ferrosalzen. S. 67.

Mayer, G. s. *J. Benedict.*

Myrbäck, K. Zur Kenntnis der Stärkespaltung durch pflanzliche Amylasen. I. S. 290.

Myrbäck, Signe s. *Karl Myrbäck.*

Myrbäck, Karl und *Signe Myrbäck.* Über freie und gebundene Amylase in der Gerste. S. 282.

Nilsson, Ivar. Zur Bestimmung von Glucosamin in Proteinstoffen. S. 386.

Nord, F. F., Else Dammann und *Heinrich Hofstetter,* mit Versuchen von *Vera Senftner* und *Elfriede Rosdorff.* Ist bei der alkoholischen Zuckerspaltung in der Zelle die Phosphorylierung zwangsläufig? Beitrag zur Biochemie von *fusarium lini B.* I. Mitteilung: (13. Mitteilung zum Mechanismus der Enzymwirkung). S. 241.

Pantschenko-Jurewicz, W. v. und *H. Kraut.* Über Struktur und Eigenschaften der Esterasen. II. Mitteilung: Ein Zusammenhang zwischen Ascorbinsäure und Leberesterase. S. 407.

Paulsen, Friedrich s. *Eskil Kylin.*

Petrucci, S. s. *G. D'Alessandro.*

Pfeiffer, G., unter Mitarbeit von *L. Clarenz.* Die analytische Bestimmung der Verdaulichkeit des Rohproteins in Futtermitteln. S. 195.

Prinz, Herbert s. *H. K. Barrenscheen.*

Rosdahl, K. G. s. *B. Eisler.*

Rosdorff, Elfriede s. *F. F. Nord.*

Roughton, F. J. W. Bemerkungen zu einer Arbeit von G. Groscurth und R. Havemann über Carb-Hämoglobin. S. 150.

Schiedt, Bruno s. *Kurt Maurer.*

Schuchardt, Werner. Über die Phosphatasen von Hefe. S. 448.

Senftner, Vera s. *F. F. Nord.*

Störmer, Inge. Follikelhormon und Blühtermin von Chrysanthemen. S. 29.

Theorell, Hugo. Reines Cytochrom c. II. Mitteilung: Darstellung, Eigenschaften, Ionenbeweglichkeit, Diffusion und Absorptionsspektrum des Cytochroms c. S. 207.

Theorell, H. s. *B. Eisler.*

Venkata Giri, K. Über Speichel-Phosphatase. S. 306.

Verzár, F. s. *L. Laszt.*

Warburg, Otto s. *Paul Karrer.*

— und *Walter Christian.* Gärungs-Co-Ferment aus roten Blutzellen. (Kurze Mitteilung). S. 156.

Weber, L. I. und *Fritz Lederer.* Einfluß von ein- und mehrwertigen Alkoholen, sowie von Mono- und Polysacchariden auf die Flüssigkeitsaufnahme durch Gele. S. 115.

Wenig, Karel und *Jiří Joachim.* Der Einfluß des Insulins auf den Lymphzuckerspiegel bei der Seidenraupe (Bombyx mori). S. 98.

Werle, E. und *J. Hürter.* Über Ornitho-Kallikrein. I. Mitteilung über kreislaufaktive Substanzen der Vögel. S. 175.

Wöhlisch, Edgar s. *Alfons Kiesgen.*

Wöhlisch, Edgar und *Alfons Kiesgen.* Untersuchungen über das viskosimetrische Verhalten des Fibrinogens. S. 200.

Zakomorny, Mikołaj s. *Tadeusz Chrząszcz.*

Zakrzewski, Z. und *Hans J. Fuchs.* Beitrag zur Mikrostickstoffbestimmung nach Kjeldahl. S. 390.